Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2014; 17(85): 54-66

Application of Alginate capsules as a three dimensional scaffold for differentiation of Wharton's Jelly Mesenchymal stem Cells to definitive endoderm

Mohseni Kouchesfahani H[1], Sanamiri KH[2], Hashemitabar M[3*]

1- Associated Professor (Ph.D) in Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
2- Master Science (MSc) in Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
3- Associated Professor (Ph.D) in Cellular and Molecular Research Center, Ahvaz Jundishapour University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Received: 4 Feb 2014, Accepted: 7 May 2014

Abstract

Background: Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJMSc) are potential renewable source of cells in replacement therapies of many diseases. Different biomaterials have been used as a scaffold to mimic the stem cell niche, which is important for promoting cellular interactions, cell proliferation and differentiation. Encapsulation involves entrapment of living cells within the semi-permeable membrane for the exchange of nutrients, oxygen and stimuli, whereas antibodies and host immune cells are kept out. In this study, a new approach for culturing and differentiating Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells to definitive endoderm in a three dimensional environment using alginate capsules is presented.

Materials and Methods: In this experimental study, Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells were capsulated and Trypan blue exclusion method was applied to determine cells viability. Then, encapsulated cells have been cultured in medium contain differentiating factors and to investigate the expression of definitive endoderm related genes, Real- time PCR was performed.

Results: The encapsulation procedure did not alter the morphology and viability of the encapsulated cells. Post-differentiation analysis confirmed the expression of FOXa2 and SOX17 as definitive endoderm specific markers.

Conclusion: Alginate has potential to be used as a three dimensional scaffold for culturing and differentiation of WJMSCs to definitive endoderm.

Keywords: Alginate, Stem Cell Niche, Wharton's Jelly Cells

*Corresponding author:
Address: Ahvaz Jundishapour University of Medical Sciences, Faculty of Medical, Cellular and Molecular Research Center
Email: hashemi-m@ajums.ac.ir

Archive of SID
.SID.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 17، شماره 4 (شماره پیاپی 85)، تیر 1393، 66-54

کاربرد کپسول های آلژینات به عنوان داربست سه بعدی جهت تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون به اندودرم قطعی

هما محسنی کوچصفهانی[1]، خدیجه سامیری[2]، محمود هاشمی تبار[3*]

1- دانشیار، گروه زیست شناسی تکوینی جانوری، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
2- کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی سلولی تکوینی جانوری، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
3- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: 92/11/15 تاریخ پذیرش: 93/2/17

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون، منبعی از سلول‌های تجدید شدنی در درمان بسیاری از بیماری‌ها می‌باشند. از مواد زیستی مختلفی به عنوان داربست جهت شبیه سازی کنام سلول‌های بنیادی استفاده شده است که در بهبود برهم کنش‌های سلولی، تکثیر سلولی و تمایز مهم می‌باشد. کپسوله کردن شامل احاطه سلول‌های زنده در یک غشا نیمه تراوا با قابلیت مبادله موادغذایی، اکسیژن و محرک‌ها است، در حالی که آنتی بادی‌ها و سلول‌های ایمنی میزبان بیرون نگه داشته می‌شوند. در این مطالعه، روشی جهت کشت و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون به اندودرم قطعی در یک محیط سه بعدی با استفاده از کپسول‌های آلژینات ارائه می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی کپسوله شده و از روش تریپان بلو برای بررسی زیست‌پذیری استفاده شد. سپس سلول‌های کپسوله شده در محیط محتوی فاکتورهای تمایزی کشت داده شدند و جهت بررسی بیان ژن‌های اندودرم قطعی Real- time PCR انجام شد.

یافته‌ها: کپسوله کردن سبب تغییر مورفولوژی و زیست پذیری سلول‌های کپسوله شده نشد. بررسی‌های پس از تمایز، بیان مارکرهای اختصاصی اندودرم قطعی شامل FOXa2 و SOX17 را اثبات کرد.

نتیجه‌گیری: آلژینات قابلیت کاربرد به عنوان یک داربست سه بعدی جهت کشت و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژل وارتون به اندودرم قطعی را دارد.

واژگان کلیدی: آلژینات، کنام سلول بنیادی، سلول‌های ژل وارتون

*** نویسنده مسئول:** اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی
Email:hashemi-m@ajums.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

سلول‌های بنیادی سلول‌هایی با پتانسیل تمایزی در مراحل مختلف تکوینی هستند که می‌توانند در ترمیم و بازسازی یک بافت آسیب دیده عمل کنند. در شرایط مناسب این سلول‌ها توان تمایز به سایر سلول‌ها و بافت‌ها را دارا می‌باشند چون دارای ویژگی خود نوزایی بوده و برای مدت طولانی می‌توانند سلول‌های شبیه خود را تولید کنند. این ویژگی‌های منحصر به فرد، آنها را کاندید مناسب جهت استفاده درمانی در بیماری‌هایی مثل بیماری‌های مزمن کبدی، صدمات نخاعی، پارکینسون، آلزایمر و حتی دیابت نموده است(1).

در قسمت‌های مختلف طناب بند ناف سلول‌هایی با مشخصات سلول‌های مزانشیمی یافت می‌شود که در سال‌های اخیر توجه دانشمندان را به خود جلب نموده است تا از آن به عنوان یک منبع مناسب برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده کنند(2). بند ناف متشکل از نوعی بافت همبند موکوسی اختصاصی به نام ژل وارتون (Wharton Jelly) و عروق خونی (دو شریان و یک ورید) می‌باشد که به عنوان یک پل ارتباطی بین مادر و جنین عمل می‌کند. ژل وارتون بند ناف از به هم پیچیدن و تحت فشار قرار گرفتن عروق خونی جلوگیری نموده و یک محیط مناسب را برای جریان دو طرفه خون بین جنین و جفت فراهم می‌سازد(3، 4).

مطالعات متعددی نشان دهنده توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون به بافت‌های مختلف مثل استخوان، غضروف، چربی، سلول‌های عصبی، قلبی، ماهیچه‌ای، کبدی و پانکراسی می‌باشد(14-5). علاوه بر این سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون با توجه به مزایایی از قبیل در دسترس بودن، امکان برداشت بی‌خطر برای دهنده، تعداد بیشتر، قدرت تکثیر بالاتر، امکان تهیه تعداد قابل توجه در زمان کم جهت پیوندهای کلینیکی، کاندیدای مناسبی برای سلول درمانی و پزشکی ترمیمی هستند(15).

در سال‌های اخیر در زمینه ترمیم بافتی توجهات زیادی به ترکیب داربست‌ها و سلول‌ها به منظور شبیه سازی خصوصیات زیستی و فیزیکی بافت‌های طبیعی بدن شده است. پروتوکل‌های رشد و تمایز سلول‌های بنیادی عمدتاً براساس سیستم‌های کشت دوبعدی بوده‌اند. در محیط دوبعدی علاوه بر محدود بودن سطوح در دسترس جهت رشد، مواد زیستی توانایی انتشار سریع از محیط کشت را دارند که این امکان در شرایط درون تنی وجود ندارد(16). اخیراً به منظور تامین یک ریز محیط مقلد کنام (niche) سلول‌های بنیادی انواع مختلفی از مواد زیستی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. کنام نقشی مهم در بهبود برهم کنش‌های سلولی، تکثیر سلولی و تمایز به دودمان‌های مختلف ایفا می‌کند(17). کپسوله کردن (encapsulation) سلول‌ها در هیدروژل‌ها باعث توزیع یکنواخت سلول‌ها در ماتریکس ژلی می‌شود. نفوذپذیری هیدروژل باعث انتشار مناسب اکسیژن، مواد غذایی و محرک‌های بیوشیمیایی محیط اطراف می‌شود. هم‌چنین سختی قابل کنترل خود هیدروژل نوعی محرک فیزیکی است(18، 19). فرآیندهای سلولی مختلف مثل تکثیر، تمایز و مهاجرت تحت تاثیر هر دو نوع محرک شیمیایی و فیزیکی هستند(20). هیدروژل‌ها نه تنها با دارا بودن یک شبکه کاملاً هیدروژنه باعث پیشبرد زیست پذیری سلولی می‌شوند بلکه آب دوستی زیاد آنها باعث می‌شود که در زمان کاشت کپسول، کشش سطحی بین هیدروژل و بافت‌ها و مایعات اطراف بسیار کم باشد و در واقع با کاهش چسبندگی بین بافت میزبان و سلول، زیست سازگاری (biocompatibility) بالایی را سبب می‌شود. به علاوه ماتریکس هیدروژلی از لحاظ ساختاری و مکانیکی به ماتریکس خارج سلولی(extracellular matrix) بسیاری از بافت‌های بدن شباهت دارد. یکی از داربست‌های زیستی که در زمینه مهندسی بافت استفاده می‌شود، هیدروژل آلژینات (Alginate) است. آلژینات پلی ساکاریدی متشکل از واحدهای مانورونیک اسید و گلوکورونیک اسید می‌باشد که از جلبک‌های قهوه‌ای به دست می‌آید(18، 19). شبکه سه بعدی هیدراته آن به سلول‌ها اجازه چسبیدن، پراکنش، مهاجرت و برهم کنش با سایر سلول‌ها را می‌دهد. این مزیت‌ها باعث شده است که این هیدروژل گزینه بسیار

Archive of SID

www.SID.ir

مناسبی جهت کشت و تمایز سلول‌ها در محیط سه بعدی باشد(16، 21).

مطالعات متعددی تولید سلول‌های انسولین ساز از سلول‌های بنیادی را به عنوان یک روش جایگزین در درمان دیابت نوع 1 مورد بررسی قرار داده‌اند در حالی که تعداد زیادی از این مطالعات از محیط‌های کشت دوبعدی استفاده کرده‌اند(16، 17). نکته قابل توجه دیگر این است که تولید درون آزمایشگاهی سلول‌های انسولین ساز بدون الگوبرداری از طبیعت و آنچه که در طی تکوین اتفاق می‌افتد، ناممکن و ناکارآمد خواهد بود. اندودرم قطعی (Definitive Endoderm) که پانکراس از آن شکل می‌گیرد، یکی از سه لا یه جنینی (اکتودرم، مزودرم و اندودرم قطعی) است که طی گاسترولاسیون ایجاد می‌شوند. مطالعات انجام گرفته بر روی جنین‌های موش نشان می‌دهد که اندودرم قطعی و مزودرم دارای دارای یک پیش ساز دو توانه مشترک هستند که مزواندودرم نامیده می‌شود. مزواندودرم از ناحیه قدامی شیار اولیه منشا می‌گیرد که پس از مهاجرت و برهم کنش با محیط و سلول‌های پیرامونی، اندودرم قطعی و مزودرم را به وجود می‌آورد(22، 23).

مطالعات ژنتیکی نشان داده‌اند که مسیرهای پیام رسانی فاکتور رشد تبدیل شونده بتا (Transforming Growth Factor Beta-TGFβ) و Wnt/β-catenin نقشی مهم طی شکل‌گیری مزودرم و اندودرم در مهره داران ایفا می‌کنند(24). مقادیر زیاد نودال (Nodal)، یک عضو از فوق خانواده TGFβ، منجر به بیان ژن‌های اندودرم قطعی مثل SOX17 و FOXa2 می‌شود در حالی که مقادیر کم آن منجر به بیان ژن‌های مزودرمی مثل ژن Brachyury می‌شود(25، 26). اکتیوین (activin)، عضو دیگر فوق خانواده TGFβ همانند نودال با اتصال به گیرنده‌های مشابه، آبشارهای پیام رسانی مشابهی را راه اندازی می‌کند. تیمار با activin a باعث انتقال سلول از مسیر مزواندودرمی می‌شود که با بیان موقتی Wnt3a، N-Cadherin، Brachyury و FGF4 همراه است(27). Wnt3a به طور مستقیم و با القای بیان Brachyury باعث انتقال کارآمد سلول‌ها از شیار اولیه به اندودرم قطعی می‌شود(28).

مطالعات کمی با هدف تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون به اندودرم قطعی انجام شده است(14، 15). بنابراین در این پژوهش براساس مراحل تکوینی پانکراس و با استفاده از یک محیط سه بعدی جهت نزدیک کردن شرایط آزمایشگاهی به شرایط درون تنی، تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون به اندودرم قطعی (به عنوان یک مرحله کلیدی در تمایز به سلول‌های انسولین ساز) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژل وارتون بند ناف انسانی

در این مطالعه تجربی که تصویر شماتیکی از مراحل انجام آن در شکل 1 ارائه شده است از سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون بند ناف انسانی که از قبل جداسازی شده و ماهیت بنیادی آنها تایید شده بود، استفاده شد(شکل 1)(15). به طور خلاصه بند ناف نوزاد تازه متولد شده در محیط (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) DMEM (گیبکو- انگلستان) حاوی آنتی بیوتیک و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد از بیمارستان به آزمایشگاه منتقل شد و از روش قطعه بافتی جهت استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بند ناف استفاده شد. سلول‌های استخراج شده در محیط DMEM حاوی 15 درصد سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum-FBS) (گیبکو–انگلستان) و 1 درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین/ استرپتومایسین کشت داده شدند و در یک اتمسفر مرطوب محتوی 95 درصد هوا، 5 درصد دی اکسید کربن، رطوبت نسبی 100 درصد و درجه حرارت 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. محیط کشت سلول‌ها، هر 48 ساعت یک بار مورد تعویض قرار گرفت. وقتی پرشدگی فلاسک به 80 درصد رسید، نمونه‌ها به کمک Trypsin-EDTA (گیبکو -انگلستان) پاساژ داده شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

شکل 1. تصویر شماتیکی از مراحل انجام کار. مرحله اول شامل کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در داربست سه بعدی می‌باشد. در مرحله دوم تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی کپسوله شده به اندودرم قطعی انجام می‌شود.

کپسوله کردن سلول های بنیادی

محلول آلژیناتی با حل کردن 1/1 گرم از پودر سدیم آلژینات (سیگما-آمریکا) در 100 میلی‌لیتر از محلول سدیم کلرید 0/9 درصد تولید شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی که در پاساژ چهارم بودند، جهت تهیه مخلوط سلول- آلژینات مورد استفاده قرار گرفتند. به این ترتیب که 1 میلی‌لیتر از محلول آلژینات به پلیت سلولی محتوی 2×10^6 سلول اضافه گردید و دوباره معلق سازی سلول‌ها انجام شد. کپسول‌های آلژینات از طریق تزریق مخلوط سلول- آلژینات توسط یک سرنگ پلاستیکی در یک حمام از کلسیم کلرید 100 میلی‌مولار (مرک- آلمان) تولید شدند. مدت 10 دقیقه اجازه داده شد تا کپسول‌ها پلیمریزه شوند. در مرحله بعد، پس از خروج کلسیم کلرید، چند مرتبه با سرم فیزیولوژیک شست و شو داده شدند و محلول شست و شو با محیط DMEM حاوی 15 درصد از FBS و 1 درصد آنتی بیوتیک جایگزین شد. محیط کشت هر دو روز یک بار مورد تعویض قرار گرفت.

انحلال کپسول های آلژیناتی

جهت دکپسوله کردن سلول‌ها، محلول سدیم سیترات 50 میلی‌مولار (مرک-آلمان) به عنوان محلول دپلیمریزه کننده مورد استفاده قرار گرفت. به این صورت که بعد از خالی نمودن محیط کشت فلاسک و چند بار شست و شو با محلول فسفات سالین (Phosphate buffer saline; PBS)، به فلاسک محتوی کپسول‌ها محلول دپلیمریزه کننده اضافه شد. پس از گذشت 10 دقیقه به منظور انحلال کامل کپسول‌ها و رهاسازی سلول‌ها به طور کامل، محلول محتوی سلول با دور 1500 به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ شده و بعد از دوباره معلق سازی پلت سلولی در PBS، سانتریفیوژ مجدد با دور 1200 به مدت 3 دقیقه انجام شد.

بررسی بقای سلول های بنیادی کپسوله شده

به منظور بررسی میزان بقای سلولی، از تریپان بلو (سیگما-آمریکا) استفاده شد. به این صورت که در روزهای مختلف از کشت سه بعدی، کپسول‌ها دپلیمریزه شدند و درصد بقای سلولی توسط رنگ آمیزی تریپان بلو مشخص شد. در این روش سلول‌های زنده به دلیل حفظ تمامیت غشایی از ورود رنگ به داخل سیتوپلاسم ممانعت می‌کنند، در صورتی که سلول‌های مرده به رنگ آبی و اندازه درشت‌تر مشاهده می‌شوند. درصد بقای سلول‌ها از طریق فرمول زیر محاسبه گردید:

درصد بقای سلولی = تعداد سلول های زنده / تعداد کل سلول‌ها × 100

تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های اندودرم قطعی

به منظور القای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون به اندودرم قطعی، یک هفته بعد از کپسوله کردن سلول‌ها محیط کشت کپسول‌ها که شامل محیط DMEM محتوی 15 درصد FBS و 1 درصد آنتی‌بیوتیک بود به طور کامل خالی شده و بعد از یک بار شست و شوی کپسول‌ها

Archive

www.SID.ir

با RPMI، محیط‌های تمایزی براساس جدول 1 به فلاسک‌های مختلف افزوده شد. به این صورت که در گروه اول به عنوان گروه کنترل هیچ نوع فاکتور رشدی به محیط افزوده نشد. گروه دوم و سوم به مدت دو روز در محیط RPMI غنی شده با فاکتورهای رشد Wnt3a(R&D system; USA) و activin A(R&D system; USA) کشت داده شدند. در حالی که هر دو گروه تحت تیمار با غلظت مشابهی از Wnt3a قرار گرفتند، غلظت‌های متفاوتی از activin A (20و 100 نانو گرم در میلی‌لیتر) به محیط کشت آنها اضافه شد. در روز سوم، سلول‌ها در محیط RPMI محتوی activin A و 0/2 درصد از FBS و به مدت 2 روز انکوبه شدند(جدول 1). 4روز پس از شروع تمایز، سلول‌ها جهت بررسی بیان ژن‌های اندودرم قطعی دکپسوله شدند.

جدول1. روش‌های تمایز سلول‌های مزانشیمی ژل وارتون کپسوله شده به اندودرم قطعی به تفکیک گروه‌ها و مراحل مختلف تمایزی

	تیمار مرحله اول(2 روز)	تیمار مرحله دوم (2 روز)
گروه 1(کنترل)	محیط کشت و 5 درصد از سرم جنین گاوی	محیط کشت و 5 درصد از سرم جنین گاوی
گروه 2	محیط کشت، activin A (100 نانوگرم در میلی لیتر) و Wnt3a (25 نانوگرم در میلی لیتر)	محیط کشت، activin A (100 نانوگرم در میلی لیتر) و 0/2 درصد از سرم جنین گاوی
گروه 3	محیط کشت، activin A (20 نانوگرم در میلی لیتر) و Wnt3a(25 نانوگرم در میلی لیتر)	محیط کشت، activin A (20 نانوگرم در میلی لیتر) و 0/2 درصد از سرم جنین گاوی

Real- Time PCR

در ابتدا با استفاده از کیت Rneasy Mini kit (کیاژن-آمریکا) کل موجودی RNA سلولی از سلول‌های مزانشیمی تمایز یافته به اندودرم قطعی، استخراج گردید. غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific; Wilmington) تعیین گردید. پس از آن 200 نانوگرم از RNA استخراج شده با استفاده از پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی و کیت cDNA synthesis kit (فرمنتاز) نسخه‌برداری معکوس گردید. Real- Time PCR روی cDNA تولید شده و به منظور بررسی کمی افزایش نسخه‌های ژن موردنظر به صورت زیر انجام گرفت. 0/4 میکرولیتر از هر پرایمر جدول 2، 7/5 میکرولیتر از SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem;USA) و 3/7 میکرولیتر آب و 3 میکرولیتر از نمونه الگو با هم ترکیب شدند. واکنش Real- Time PCR با استفاده از دستگاه Applied Biosystem Step One PlusTM(USA) انجام شد. در نهایت بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش ΔΔCT به دست آمد. از GAPDH نیز به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید.

یافته‌های به دست آمده با نرم افزار آماری SPSS نسخه 16 و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه، در سطح معنی‌داری $p<0/05$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تمام داده‌ها براساس میانگین±انحراف معیار ارائه شده‌اند.

جدول 2. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای واکنش Real- Time PCR

نام پرایمر	توالی پرایمر(5′-3′)
GAPDH	Forward TGGTATCGTGGAAGGACTCA Reverse CCTGCTTCACCACCTTCTTG
FOXa2	ForwardAATGGACCTCAAGGCCTACGAAC A ReverseAGTTCATAATGGGCCGGGAGTACA
SOX17	Forward TGGACCGCACGGAATTTGAACA Reverse TTGCAGTAATATACCGCGGAGCTG

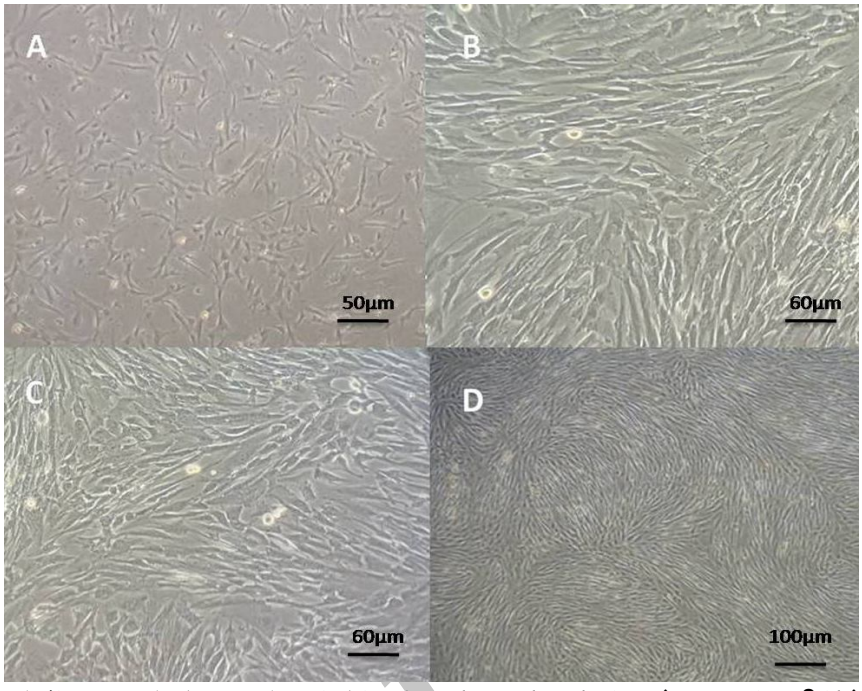
یافته ها

کشت سلول

در کشت اولیه، تعداد بسیاری از سلول‌ها طی 24 ساعت اولیه به کف ظرف چسبیدند (شکل A:2). با انجام اولین پاساژ تکثیر سلول‌های دوکی تحریک شد به طوری که پس از پاساژ چهارم کلنی‌های مواج و شبیه اثر انگشت از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشاهده شد (شکل B-D :2).

Archive of SID

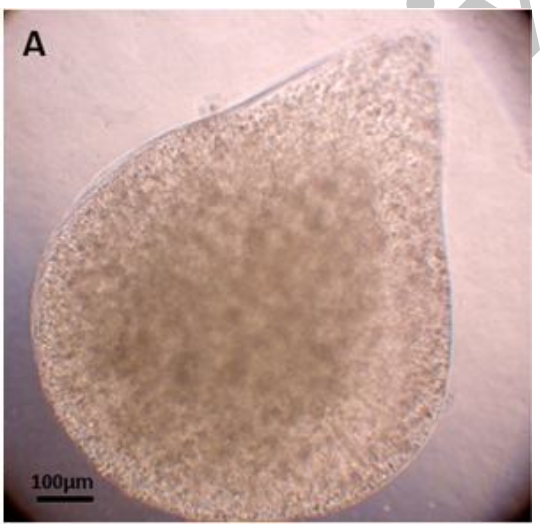
www.SID.ir



شکل2. تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ معکوس از سلول‌های مزانشیمی ژل وارتون بند ناف انسانی بعد از پاساژهای مختلف: A: سلول‌های چسبیده 24 ساعت پس از کشت اولیه، B: بعد از پاساژ دوم، C: بعد از پاساژ سوم D: بعد از پاساژ چهارم زمانی که تراکم سلولی (confluence) به حداکثر ممکن رسیده است.

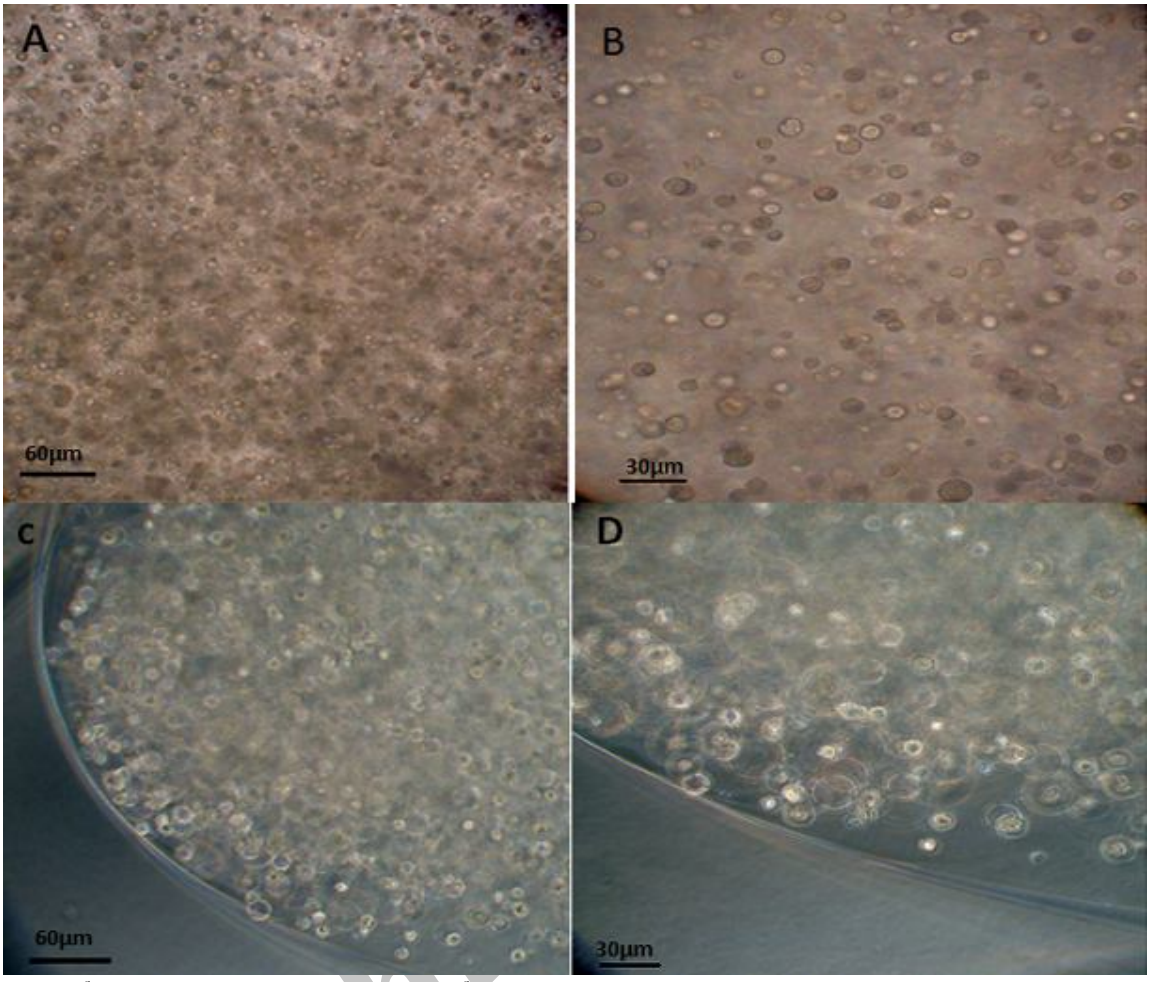
بررسی‌های مورفولوژیک کپسول‌های آلژیناتی و سلول‌های بنیادی محصور در آنها

مشاهدات انجام گرفته در این مطالعه نشان داد که میانگین قطر کپسول‌های آلژیناتی محتوی سلول‌های بنیادی 650(4) میکرومتر می‌باشد. کپسول‌ها به شکل کروی و دارای حاشیه‌های یکنواخت بودند و سلول‌ها به صورت هموژن در سرتاسر کپسول پراکنده شده بودند(شکل 3). تصاویر نشان دهنده این بود که کپسول‌ها حتی پس از گذشت 10 روز تمامیت ساختاری و شکل کروی خود را حفظ کرده‌اند. هم‌چنین سلول‌های کپسوله شده تا روز دهم در ماتریکس آلژیناتی محصور مانده‌اند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون درون کپسول‌های آلژیناتی و در حالی که به سطحی اتصال ندارند دایره مانند هستند که شبیه شکل مدور سلول‌های بنیادی در طناب بند ناف است. بنابراین در این مطالعه فرآیند کپسوله کردن سلولی باعث تغییر در مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون نمی‌شود(شکل 4).



شکل3. ایجاد کپسول‌های محتوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون بند ناف انسانی . A- کپسول‌های آلژیناتی محتوی سلول‌های بنیادی شکل کروی به خود گرفته و آن را حفظ کرده‌اند. تصویر میکروسکوپی کپسول‌های محتوی سلول‌های بنیادی نشان دهنده توزیع یکنواخت سلول‌ها (نقاط تیره) در بستر آلژیناتی می‌باشد. قطر میانگین کپسول‌ها 650(4) میکرومتر می‌باشد.

www.SID.ir



شکل 4. مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط سه بعدی کپسول‌های آلژیناتی. سلول‌های بنیادی درون کپسول‌های آلژیناتی و در حالی که به سطحی اتصال ندارند دایره مانند هستند. A,B - سلول‌های موجود در مرکز کپسول‌ها در مقایسه با C,D - سلول‌های موجود در حاشیه کپسول‌ها دارای مورفولوژی یکسانی هستند.

بررسی بقای سلول‌های بنیادی کپسوله شده

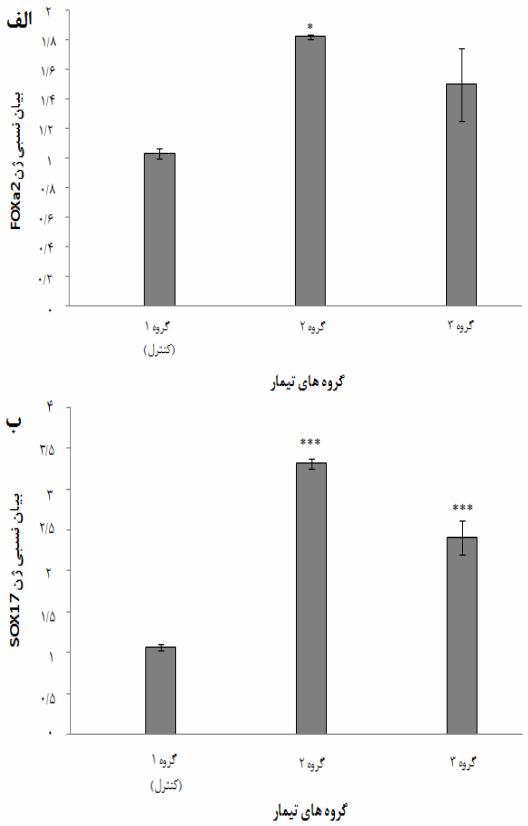
به منظور بررسی تاثیر فرآیند کپسوله کردن سلول‌ها در هیدروژل آلژینات، میزان بقا و زیست پذیری سلولی از روش رنگ آمیزی تریپان بلو استفاده شد. نتیجه حاصل از این بررسی در مورد گروهی که سلول‌ها بلافاصله بعد از کپسوله شدن، دکپسوله شده بودند، نشان دهنده 98 درصد بقای سلولی بود. بعد از گذشت 10 روز از کپسوله شدن سلول‌ها، بقای سلولی هم‌چنان در سطح بالایی باقی مانده و به طور میانگین حدود 72(2) درصد بود.

بررسی بیان ژن‌های اندودرم قطعی در سلول‌های دکپسوله شده پس از القای تمایز به سمت اندودرم قطعی

برای تعیین تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون به سلول‌های اندودرم قطعی، بیان دو مارکر اختصاصی اندودرم قطعی شامل FOXa2 و SOX17 مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی سه گروه مورد مطالعه قرار گرفتند(جدول 1). براساس نتایج حاصل از این مطالعه، بیشترین میزان بیان ژن FOXa2 در گروه دوم (افزایش 1/82 برابری) مشاهده شد، که اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل و گروه سوم داشت($p<0/05$). گروه دوم تحت تیمار با غلظت بالاتری از activin A (100 نانو گرم در میلی‌لیتر) قرار گرفته بود. میزان بیان این ژن در گروه سوم افزایش 1/49 برابری در مقایسه با گروه کنترل داشت($p<0/05$) (نمودار 1: الف). بیشترین میزان بیان ژن

Archive
www.SID.ir

SOX17 در گروه دوم (افزایش 3/32 برابری) مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل و گروه سوم داشت($p<0/01$). میزان بیان این ژن در گروه سوم افزایش 2/41 برابری در مقایسه با گروه کنترل داشت($p<0/01$) (نمودار 1: ب).



نمودار 1. نتایج حاصل از بررسی بیان نسبی دو ژن FOXa2 و SOX17 بعد از تیمار به منظور القای تمایز به اندودرم قطعی در سلول‌های مزانشیمی. الف. بیان نسبی FOXa2 . در گروه تیماری دوم بیان این ژن در مقایسه با گروه کنترل قابل توجه بوده است. ب. بیان نسبی SOX17. بیان این ژن در هر دو گروه تیماری در مقایسه با گروه کنترل قابل توجه بوده است. (* $p<0.05$, *** $p<0.01$)

بحث

در این پژوهش از پلی ساکارید طبیعی به نام آلژینات برای طراحی یک داربست سه بعدی جهت کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون و نیز بررسی تمایز این نوع از سلول‌های بنیادی به اندودرم قطعی به عنوان یک مرحله کلیدی در تمایز به سلول‌های پانکراسی پرداخته شد. تحقیقات ما نشان داد که که آلژینات ترکیبی مناسب و غیرکشنده جهت کپسوله کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون است. این ترکیب زیست پذیری و مورفولوژی سلول‌های بنیادی را تحت تاثیر قرار نمی‌دهد(شکل 3 و 4). بررسی‌های مولکولی نیز نشان داد که سلول‌های کپسوله شده در این محیط سه بعدی در حضور فاکتورهای تمایزی توانایی تشکیل اندودرم قطعی را دارند(نمودار 1).

98 درصد زیست پذیری در سلول‌های گروه اول که بلافاصله بعد از کپسوله شدن، دکپسوله شده بودند نشان دهنده این است که فرآیند کپسوله کردن و دکپسوله کردن سلولی مورد استفاده در این پژوهش باعث کاهش زیست‌پذیری سلولی نمی‌شود. مشابه این مطالعه در سال 2009 توسط وانگ و همکاران بر روی سلول‌های بنیادی جنینی انجام شد، آنها نشان دادند که فرآیند کپسوله کردن سلول‌ها در آلژینات تاثیری بر بقای این سلول‌ها ندارد(16). بررسی زیست‌پذیری در روزهای بعد نشان داد که آلژینات، تامین کننده یک محیط زیست سازگار برای سلول‌های بنیادی ژل وارتون می‌باشد؛ بعد از گذشت 10 روز از کپسوله شدن سلول‌ها، زیست‌پذیری هم چنان در سطح بالایی باقی مانده و حدود 72 درصد بود. هر چند در مطالعه مشاوری نیا و همکاران که از سدیم آلژینات برای کپسوله کردن سلول‌های بنیادی دندان استفاده کرده بودند، سطح بالای زیست پذیری (حدود 90درصد) پس از گذشت 28 روز گزارش شده است(29). به نظر می‌رسد کپسول آلژیناتی با فراهم سازی جریان رو به داخل مقادیر کافی مواد غذایی و اکسیژن و جریان روبه خارج متابولیت‌های سلولی در زیست پذیری‌سلولی اختلال ایجاد نمی‌کند. که این امر در مورد سلول‌های مرکز و حاشیه کپسول‌ها صدق می‌کند. به علاوه می‌توان گفت که اندازه کوچک کپسول‌ها در انتقال دوطرفه مواد موثر می‌باشد. در پژوهش حاضر، کپسول‌های تولید شده کوچک و دارای قطر 650(4) میکرومتر بودند که این قطر زمینه ساز ورود مقادیر کافی اکسیژن و دفع مواد زائد از سلول‌های بنیادی کپسوله شده در هیدروژل آلژینات می‌باشد(16، 18).

Archive

www.SID.ir

اولین مرحله در تمایز سلول‌های چند توانه به سلول‌های پانکراسی، مشابه شرایط درون تنی، شکل‌گیری سلول‌های اندودرم قطعی می‌باشد(22، 23). پیام رسان‌های Nodal و Wnt فاکتورهای القاکننده اصلی در سلول‌های انسانی و موشی هستند که این روند تمایزی را القا می‌کنند. مطالعات متعددی از activin A جهت شبیه سازی نقش Nodal استفاده کرده‌اند. به علاوه، تیمار ابتدایی با Wnt3a باعث پیشبرد شکل‌گیری اندودرم قطعی از جمعیت پیش ساز مزواندودرمی می‌شود(15).

در این مطالعه، جهت بررسی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون به اندودرم قطعی، بیان ژن‌های FOXa2 و SOX17، به عنوان دو مارکر اختصاصی اندودرم قطعی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن به وسیله تکنیک Real- time PCR نشان دهنده افزایش بیان این دو ژن در سلول‌های بنیادی دکپسوله شده تحت تیمار تمایزی در مقایسه با سلول‌های دکپسوله شده در گروه کنترل بود، که تایید کننده این است که کپسول آلژیناتی به عنوان یک داربست سه بعدی محیطی مناسب جهت القای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژل وارتون به اندودرم قطعی می‌باشد. هم‌چنین افزایش بیان این دو ژن در گروه دوم در مقایسه با گروه سوم نشان می‌دهد که در مورد سلول‌های بنیادی کپسوله شده در آلژینات غلظت 100 نانوگرم از activin A در مقایسه با غلظت 20 نانوگرم از این فاکتور تمایزی باعث تمایز کارآمدتری می‌شود. علاوه بر این، نتایج حاصل از بررسی بیان ژن نشان دهنده تاثیر مثبت کپسوله کردن آلژیناتی سلول‌های بنیادی بر افزایش بیان ژن‌های FOXa2 و SOX17 در غلظت 100 نانوگرم از activin A در مقایسه با کشت دوبعدی سلول‌ها می‌باشد(15). نتایجی مشابه با این موارد توسط چیوسمریت و همکاران در سال 2010 ارائه شده است. آنها در این مطالعه موفق به تمایز سلول‌های بنیادی جنینی کپسوله شده به اندودرم قطعی با استفاده از activin A و Wnt3a شدند(17).

در مطالعه‌ای دیگر، اله بخشی و همکاران تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون بند ناف انسانی به سمت اندودرم قطعی را در محیط دوبعدی مورد مطالعه قرار دادند. آنها در این مطالعه و براساس پروتوکلی مشابه با روش تمایزی به کار رفته در این مطالعه از غلظت‌های مختلف activin A و Wnt3a جهت القای تمایز به اندودرم قطعی استفاده کردند. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن‌های اندودرم قطعی نشان می‌داد که استفاده از غلظت‌های 100 نانوگرم در میلی‌لیتر از activin A و 25 نانوگرم در میلی‌لیتر از Wnt3a به مدت 1 روز و به دنبال آن حذف Wnt3a و ادامه تیمار با غلظت 100 نانوگرم از activin A به مدت 2 روز باعث افزایش 1/68 و 2/75 برابری در بیان ژن‌های FOXa2 و SOX17 در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. به عبارت دیگر در مطالعه آنها مشخص شد که غلظت کم activin A (20 نانوگرم) در مقایسه با غلظت‌های بالا (100 نانوگرم) منجر به تمایز کارآمدتر سلول‌های بنیادی ژل وارتون به اندودرم قطعی می‌شود(15). هر چند در مطالعه ما غلظت بالای activin A (100 نانوگرم) در مقایسه با غلظت کم (20 نانوگرم) این ماده به طور معنی‌دار باعث افزایش بیان ژن‌های مربوط به اندودرم قطعی شد. با توجه به این که اندازه قطر کپسول‌ها در انتقال دو طرفه مواد موثر می‌باشد، یکی از دلایل تفاوت یافته‌های این پژوهش با پژوهش اله بخشی و همکاران احتمالاً ناشی از اندازه بزرگ کپسول‌های آلژینات در پژوهش حاضر می‌باشد. به نظر می‌رسد با کاهش بیشتر قطر کپسول‌ها با استفاده از روش‌هایی مثل تزریق الکتریکی و تزریق هوایی می‌توان آن را بهبود بخشید.

مطالعات ژنتیکی نشان داده‌اند که مسیرهای پیام رسانی فاکتور رشد تبدیل شونده بتا (TGFβ) و Wnt/β-catenin نقشی مهم طی شکل‌گیری مزودرم و اندودرم در مهره داران ایفا می‌کنند. مقادیر زیاد نودال، یک عضو از فوق خانواده TGFβ، منجر به بیان ژن‌های اندودرم قطعی مثل SOX17 و FOXa2 می‌شود در حالی که مقادیر کم آن منجر به بیان ژن‌های مزودرمی مثل ژن Brachyury

Archive of SID

www.SID.ir

می‌شود(25، 26). اکتیوین، عضو دیگر فوق خانواده TGFβ همانند نودال با اتصال به رسپتورهای مشابه آبشارهای پیام رسانی مشابهی را راه‌اندازی می‌کند. تیمار با activin A باعث انتقال سلول از مسیر مزواندودرمی می‌شود که با بیان موقتی Wnt3a, N-Cadherin, Brachyury و FGF4 همراه است(27). Wnt3a به طور مستقیم و با القای بیان Brachyury باعث انتقال کارآمد سلول‌ها از شیار اولیه به اندودرم قطعی می‌شود(28).

در این مطالعه از از سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون بند ناف انسانی استفاده شد که با توجه به مزایایی از قبیل در دسترس بودن، امکان برداشت بی‌خطر برای دهنده، تعداد بیشتر، قدرت تکثیر بالاتر، امکان تهیه تعداد قابل توجه در زمان کم جهت پیوندهای کلینیکی، کاندیدای مناسبی برای سلول درمانی و پزشکی ترمیمی هستند(15).

نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که کپسول‌های متشکل از آلژینات محتوی مقادیر متوسط گلوکورونیک اسید، قابلیت استفاده به عنوان یک داربست سه بعدی جهت کشت و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون به اندودرم قطعی را دارد. بنابراین در صورت انجام مطالعات بیشتر در سطوح درون تنی و برون تنی به منظور بررسی تاثیرات این ترکیب بر سلول‌های بنیادی و ادامه مراحل تمایزی تا تشکیل سلول‌های بتای کاملاً عملکردی، این داربست زیست تجزیه پذیر می‌تواند گزینه مناسبی برای تولید سلول‌های انسولین ساز باشد و به عنوان یک روش ایمن از لحاظ ایمنی‌زایی در پیوند و درمان بیماران مبتلا به دیابت مورد استفاده قرار بگیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه خانم خدیجه سنامیری با عنوان " تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژل وارتون به اندودرم قطعی در کپسول‌های آلژینات " برای اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی سلولی تکوینی جانوری از دانشگاه خوارزمی تهران بود. بدین وسیله از تمامی همکاران محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز که ما را در این تحقیق یاری نمودند کمال تشکر را داریم.

منابع

1. Pournasr B, Farzaneh Z, Shahsanvani M, Baharvand H. Liver Development and In vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells to Hepatocytes. Yakhteh Medical Journal. 2010;11(4): 348-73.
2. Troyer DL, Weiss ML. Concise Review: Wharton's Jelly-Derived Cells Are a Primitive Stromal Cell Population. Stem cells. 2008;26(3):591-9.
3. Can A, Karahuseyinoglu S. Concise Review: Human Umbilical Cord Stroma with Regard to the Source of Fetus-Derived Stem Cells. Stem cells. 2007;25(11):2886-95.
4. Taghizadeh R, Cetrulo K, Cetrulo C. Wharton’s Jelly stem cells: Future clinical applications. Placenta. 2011;32:S311-S5.
5. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem cells. 2004;22(7):1330-7.
6. Wang L, Zhao L, Detamore MS. Human umbilical cord mesenchymal stromal cells in a sandwich approach for osteochondral tissue engineering. Journal of tissue engineering and regenerative medicine. 2011;5(9):712-21.
7. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. Stem cells. 2005;23(2):220-9.
8. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DÖ, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. Stem cells. 2007;25(2):319-31.
9. Fong C-Y, Richards M, Manasi N, Biswas A, Bongso A. Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. Reproductive biomedicine online. 2007;15(6):708-18.

Archive of SID

www.SID.ir

10. Corrao S, La Rocca G, Lo Iacono M, Zummo G, Gerbino A, Farina F, et al. New Frontiers in Regenerative Medicine in Cardiology: The Potential of Whartons Jelly Mesenchymal Stem Cells. Current stem cell research & therapy. 2013;8(1):39-45.
11. Conconi MT, Burra P, Di Liddo R, Calore C, Turetta M, Bellini S, et al. CD105 (+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. International Journal of Molecular Medicine. 2006;18(6):1089-96.
12. Scheers I, Lombard C, Najimi M, Sokal E. Cell Therapy for the Treatment of Metabolic Liver Disease: An Update on the Umbilical Cord Derived Stem Cells Candidates. Open Tissue Engineering & Regenerative Medicine Journal. 2011;4: 48-53.
13. Chao KC, Chao KF, Fu YS, Liu SH. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. PloS one. 2008;3(1):e1451-2.
14. Anzalone R, Iacono ML, Loria T, Di Stefano A, Giannuzzi P, Farina F, et al. Wharton's jelly mesenchymal stem cells as candidates for beta cells regeneration: extending the differentiative and immunomodulatory benefits of adult mesenchymal stem cells for the treatment of type 1 diabetes. Stem Cell Reviews and Reports. 2011;7(2):342-63.
15. Allahnakhshi E, Nejad DB, Shariati M, Tabandeh MR, Dehbashi FN, Hashemi Tabar M. Differentiation of the definitive endoderm from Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJMSC). Journal of biological research-Thessalon. 2013; 20: 217-27.
16. Wang N, Adams G, Buttery L, Falcone FH, Stolnik S. Alginate encapsulation technology supports embryonic stem cells differentiation into insulin-producing cells. Journal of biotechnology. 2009;144(4):304-12.
17. Chayosumrit M, Tuch B, Sidhu K. Alginate microcapsule for propagation and directed differentiation of hESCs to definitive endoderm. Biomaterials. 2010;31(3):505-14.
18. Man Y, Wang P, Guo Y, Xiang L, Yang Y, Qu Y, et al. Angiogenic and osteogenic potential of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cell laden alginate microspheres. Biomaterials. 2012;33(34):8802-11.
19. Mazzitelli S, Vecchiatini R, Penolazzi L, Lambertini E, Piva R, Nastruzzi C. Microencapsulation Procedures for the Immunoisolation of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells: A Review. Stem Cells and Cancer Stem Cells, Volume 4: Springer; 2012. p. 175-91.
20. Candiello J, Singh SS, Task K, Kumta PN, Banerjee I. Early differentiation patterning of mouse embryonic stem cells in response to variations in alginate substrate stiffness. J Biol Eng. 2013;7(1):9:1-14.
21. Ceccaldi C, Fullana SG, Alfarano C, Lairez O, Calise D, Cussac D, et al. Alginate scaffolds for mesenchymal stem cell cardiac therapy: influence of alginate composition. Cell transplantation. 2012;21(9):1969-84.
22. D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, et al. Production of pancreatic hormone–expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. Nature biotechnology. 2006;24(11):1392-401.
23. Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazer S, et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. Nature biotechnology. 2008;26(4):443-52.
24. Semb H. Definitive endoderm: a key step in coaxing human embryonic stem cells into transplantable beta-cells. Biochemical Society Transactions. 2008;36(3):272-5.
25. Takenaga M, Fukumoto M, Hori Y. Regulated Nodal signaling promotes differentiation of the definitive endoderm and mesoderm from ES cells. Journal of cell science. 2007;120(12):2078-90.
26. Teo AKK, Arnold SJ, Trotter MW, Brown S, Ang LT, Chng Z, et al. Pluripotency factors regulate definitive endoderm specification through eomesodermin. Genes & development. 2011;25(3):238-50.
27. Liew C-G. Generation of insulin-producing cells from pluripotent stem cells: from the selection of cell sources to the optimization of protocols. The review of diabetic studies: RDS. 2010;7(2):82-92.

Archive of SID

www.SID.ir

28. Mfopou JK, Chen B, Sui L, Sermon K, Bouwens L. Recent advances and prospects in the differentiation of pancreatic cells from human embryonic stem cells. Diabetes. 2010;59(9):2094-101.

29. Moshaverinia A, Chen C, Akiyama K, Ansari S, Xu X, Chee WW, et al. Alginate hydrogel as a promising scaffold for dental-derived stem cells: an in vitro study. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2012;23(12):3041-51.

Archive of SID

www.SID.ir