# Evaluation Of Protective Effects Of Alginate Hydrogel During Neurons Transdifferentiated From Bone Marrow Stromal Cells On Decrease Of Reactive Oxygene Specious

**Leila Salari asl[1], Taki Tiraihi[2]**

1.Master of Sciences, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical sciences, Tarbiat modares university, Tehran, Iran

2.Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical sciences, Tarbiat modares university, Tehran, Iran, (Corresponding Author): Postal code: 14155-4833, Tel: 09128151824, Email: Takialtr@modares.ac.ir.ORCID ID : 0000-0003-5512-4777

## ABSTRACT

**Background and Aim**: Cell therapy is a feasible method for thetreatment of spinal cord injury as well as other neurological disorders. Because of the cell death reported to be in the cell transplants, the use of +scaffolds can be useful to improve cell protection, resulting in an increase in their survival and growth, and differentiation. Since alginate hydrogel biopolymer was reported to be effective in treating spinal cord lesions, in this study, we intended to evaluate the protectivity of alginate hydrogel against free radicals in the cultured neural stem cells (NSCs) induced into neuronal phenotype using valproic acid as inducer, and improvement of their survival will be assessed.

**Materials and Methods**: Bone marrow stromal stem cell-derived neural stem cells encapsulated in alginate hydrogel, were used in this study. The encapsulated cells were induced by valproic acid and the cells were evaluated by immunocytochemical methods and reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The induction of apoptosis was achieved by hydrogen peroxide ($H_2O_2$), and the cell viability was evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). The Protective Effect of alginate hydrogel in front of H2O2 was evaluated by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and MTT. The control groups were two-dimensional (2-D) cultured of the induced NSCs into neuronal phenotype by valproic acid as well as induction of apoptosis by H2O2

**Results**: The results showed that the viability of neuronal phenotype treated by H2O2 in alginate hydrogel was higher than that of cells cultured under the same condition in 2-D culture, also, the expression of Bcl2 and survivin was higher, while the expression of Bax was lower. Similar results were noticed with the FRAP technique

**Conclusion**: The results showed that alginate hydrogel has a protective effect on the induced NSCs into neuron-like cells, following induction of apoptosis by H2O2. The results of gene expression and FRAPwere consistent with the above results

**Keywords**: Alginate hydrogel, neuroprotection, 3D culture, induction, neural stem cell, Valproic acid

**Received:** May 16, 2019 **Accepted:** Oct 9, 2021

**How to cite the article:** Leila Salari asl, Taki Tiraihi. Evaluation Of Protective Effects Of Alginate Hydrogel During Neurons Transdifferentiated From Bone Marrow Stromal Cells On Decrease Of Reactive Oxygene Specious . SJKU 2023;28(1):1-19.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06 ]

[ DOI: 10.61186/sjku.28.1.1 ]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و هشت / فروردین اردیبهشت ۱۴۰۲/۱۹-۱

# ارزیابی اثر پیشگیری کننده هیدروژل آلژینات در طی تمایز نورون های تمایز یافته از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر کاهش میزان استرس اکسیداتیو

**لیلا سالاری اصل[1]، تقی طریحی[2]**

۱.دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲.استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران،( نویسنده مسئول)، Takialtr@modares.ac.ir

تلفن ثابت :۰۲۱-۳۳۷۴۳۴۵۸

## چکیده

**زمینه و هدف:** سلول درمانی یکی از روش های درمانی امیدوار کننده جهت درمان ضایعات نخاعی به شمار می‌رود. اما به دلیل وقوع مرگ سلولی پس از انتقال سلول ها به محل آسیب و هم چنین مهاجرت این سلول ها به نواحی دیگر غیر از محل ضایعه بعلت نبود یک بستر مناسب برای سلول ها استفاده از این روش محدود شده است. حدودا ۳۰ سال است که مهندسی بافت با استفاده از داربست ها و ناقل های سلولی جهت انتقال سلول های موردنظر به بدن میزبان به کمک سلول درمانی آمده است. از رایج ترین ناقل های سلولی مورد استفاده در مهندسی بافت، هیدروژل ها هستند. در این مطالعه از هیدروژل آلژینات استفاده شده و اثر حفاظتی آن بر سلول های انکپسوله در مقابل رادیکال های آزاد مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش ها :** سلول های بنیادی عصبی مشتق شده از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در هیدروژل آلژینات کپسول دار شدند و تحت القای والپروئیک اسید به مدت یک هفته به نورون تمایز یافتند؛ سلول ها با روش های ایمونوسیتوشیمی و واکنش زنجیره ای پلی مراز معکوس ارزیابی شدند. القای آپوپتوز توسط پراکسیدهیدروژن انجام شد و میزان بقای سلول ها با روش MTT بررسی شد. سپس اثر حفاظتی هیدروژل در محیط آلژینات بر سلول های کپسول دار شده در مقابل $H_2O_2$ بررسی شد و با سلول های کشت شده در محیط کشت دوبعدی با استفاده از روش های MTT و Frap مقایسه شد.

**یافته ها:** نتایج نشان داد که میزان حیات سلول های قرار گرفته در هیدروژل، تفاوت معناداری با میزان حیات سلولی در محیط کشت دوبعدی داشت. هم چنین نتایج RT-PCR بیان mRNA ژن های Survivin و $Bcl_2$ را در گروه سلول های کپسول دار شده در هیدروژل آلژینات و بیان mRNA ژن Bax را در گروه سلول های کشت شده در محیط کشت دوبعدی نشان داد که نشان دهنده افزایش آپوپتوز در گروه کشت شده دوبعدی و تفاوت آن با سلول های کپسول دار شده بود .همچنین نتایج تست Frap گروه سلول های اکپسول دار شده در هیدروژل با گروه سلول های دو بعدی تفاوت معناداری داشت که نشان دهنده خاصیت آنتی اکسیدانی هیدروژل آلژینات بود و در بررسی میزان ROS بین دو گروه دو بعدی و سه بعدی تفاوت معناداری داشت.

**نتیجه گیری:** هیدروژل آلژینات از ناقل های سلولی مناسب جهت کشت سلول های بنیادی عصبی است که اثرات مفیدی در حفاظت سلول ها در مقابل $H_2O_2$ دارد.

**کلمات کلیدی:** هیدروژل آلژینات، حفاظت عصبی، کشت سه بعدی، القا، سلول های بنیادی عصبی، والپروئیک اسید

وصول مقاله:۹۸/۲/۱۶ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۱/۱/۲۰ پذیرش:۱۴۰۰/۷/۱۷

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06 ]

[ DOI: 10.61186/sjku.28.1.1 ]

**مقدمه**

عده زیادی از مردم جهان به آسیب های نخاعی مبتلا هستند که مشقات فراوانی را برای این قبیل از بیماران به همراه دارد. بر این اساس باید بتوان درمانی برای این ضایعات و سایر اختلالات عصبی یافت، سلول درمانی یکی از روش های درمانی مناسب جهت بازگرداندن سلول هایی است که در طی آسیب های عصبی مرکزی از دست رفته اند(۱). سلول های بنیادی عصبی انتخاب مناسبی برای این روش درمانی به حساب می آیند، یکی از منابع مهم تهیه سلول های بنیادی عصبی، سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان می‌باشند. در این مطالعه از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به عنوان منبع سلولی استفاده شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بعنوان بهترین سلول های بنیادی در جهت سلول درمانی شناخته شده اند. به دلیل آنکه این سلول ها به راحتی تهیه و کشت داده می‌شوند، خالص کردنشان آسان است زیرا به کف ظرف کشت می‌چسبند و از سلول‌های رده خونی تفکیک می‌شوند(۲)، در شرایط in vivo به مدت طولانی زنده می‌مانند، ژن های اکتودرمال، مزودرمال و اندودرمال را بیان می کنند، واکنش ایمنی در میزبان ایجاد نمی کند و و کاربرد آن ها هیچ گونه موانع اخلاقی قانونی ندارد(۳)، قدرت خودتکثیری وتمایز بالایی را در in vitro دارند، به طوری که قادرند در شرایط in vitro, in vivo به سلول های عصبی تمایز یابند(۴). با استفاده از مواد القا کننده می توان مسیر تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (BMSC)را به سمت رده خاصی از سلول های عصبی هدایت نمود و درصد بالایی از سلول های عصبی را به دست آورد.

اما با وجود مزایای فراوان استفاده از روش سلول درمانی در درمان آسیب های نخاعی، کاربرد این روش به علت آنکه تنها عده کمی از سلول های انتقال یافته پس از انتقال به سیستم عصبی مرکزی زنده می‌مانند، بسیار محدود شده است(۶, ۵). بنابراین استفاده از روش هایی که میزان حیات و تقسیم سلول‌های بنیادی عصبی را پس از انتقال به بدن بیمار افزایش دهد، ضروری به نظر می‌رسد. یکی از روش های مناسب جهت دستیابی به این هدف، استفاده از ناقل های سلولی است(۷).

یکی از مناسب ترین این ناقل ها، هیدروژل ها هستند و برای ساختن آن ها از مواد و ترکیبات مختلفی می توان استفاده کرد به طور مثال آلژینات ازقبیل مواد مفید و مورد استفاده در ساخت هیدروژل ها می‌باشد. آلژینات یک پلی ساکارید خطی غیرمنشعب است و از یک جلبک قهوه ای به دست می آید و از واحد های تکرار شونده الفا ال- گلورونیک اسید و بتا- دی منورونیک اسید ساخته شده است(۸). و به منظور تشکیل هیدروژل از کاتیون های چندظرفیتی مانند کلسیم استفاده می‌شود، زیرا این پلی‌ساکارید خود دارای واحد های گلورونیک اسید با بار منفی است که با کمک کاتیون ها پیوند یونی برقرار می کند(۹) واین زنجیره های پلی‌ساکاریدی این امکان را دارند که با هم تشکیل شبکه هایی را بدهند و به صورت هیدروژل جهت انکپسوله کردن سلول ها به دست آیند Marina Matyash و همکاران در سال ۲۰۱۲ خاصیت حفاظتی آلژینات برای سلول های تیمار شده با رادیکال های آزاد را مورد بررسی قرار دادند.

این پلی ساکارید دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی برای سلول ها می باشند و نیز می توانند از سلول ها در مقابل رادیکال های آزاد حفاظت کنند(۱۰)، آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که می توانند آسیب های اکسیداتیو ناشی از وجود رادیکال های آزاد را کاهش دهند و به دو دسته طبیعی و سنتتیک تقسیم می شوند(۱۱). آلژینات به عنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی به علت زیست سازگاری و غیرسمی بودن بسیار مورد توجه قرار گرفته است(۱۲). رادیکال های آزاد مولکول های پرانرژی هستند که در طی متابولیسم نرمال و تنفس سلولی تولید می‌شوند. این مولکول ها ترکیبات شیمیایی می‌باشند که در اوربیت خارجی خود دارای یک و یا بیش از یک الکترون جفت نشده هستند. این الکترون ها فعالیت شیمیایی یک اتم و یا مولکول را تغییر می‌دهند و



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06 ]

[ DOI: 10.61186/sjku.28.1.1 ]

توانایی دریافت الکترون از دیگر مولکول ها و آسیب شدید به این مولکول ها را دارند(۱۳)؛ زمانی که بین تولید درون سلولی ROS و سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی سلول تعادل نباشد ، استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود. استرس اکسیداتیو در آسیب های مکانیکی که به سیستم عصبی مرکزی وارد می شود یک فاکتور مهم در پاتوژنز و آسیب به سیستم عصبی است (۱۴) از آنجایی که پس از آسیب های عصبی، در محل ضایعه تولید رادیکال های آزاد را داریم، این مواد می توانند اثر سوئی بر رشد سلول های عصبی داشته باشند و نیز حتی بر سلول های جایگزین شده با روش سلول درمانی هم اثر تخریب کننده دارند و باید سلول های استفاده شده در روش سلول درمانی توسط یک ناقل سلولی با خاصیت آنتی اکسیدانی حفاظت شوند؛ لذا این تحقیق با هدف بررسی اثر حفاظتی هیدروژل آلژینات بر سلول ها در مقابل رادیکال های آزاد انجام شد.

## روش ها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان:

سلول های مغز استخوان از موش های صحرایی بالغ نژاد Sprague-Dawley ۱۲ هفته تهیه شدند این مطالعه طی نامه به شماره ۶۵۸۷/۵۲ و به تاریخ ۱۹,۱۲,۲۰۱۵ به تایید کمیته اخلاق رسیده است. ابتدا استخوان‌های فموروتیبیای آنها جدا گردید. استخوان های جدا شده در داخل پتری دیش حاوی PBS (Phosphate buffered salin) و پنی سیلین گذاشته شد و به زیر هود منتقل گردید. در زیر هود، اپی‌فیزهای استخوان‌ها جدا شد و توسط سرنگ با Gage ۲۲ حاوی محیط کشت DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) و ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovin Serum) محتویات مغز استخوان در دیافیزها در فلاسک مخصوص کشت سلولی تخلیه شد. سپس، فلاسک ها داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس د، رطوبت ۹۵ درصد و $CO_2$ ۵ درصد نگهداری شد. پس از ۲۴ ساعت محیط تعویض شد و بدین طریق سلول های خونساز و ذرات بافتی موجود در محیط کشت از سلول های استرومایی مغز استخوان جدا گردید.

این سلول ها توانایی چسبیدن به کف فلاسک را داشتند و در نتیجه باقی ماندند. پس از آنکه این سلول‌ها کف فلاسک را پر کردند، با استفاده از تریپسین/ EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid)از کف فلاسک جدا شده و تقسیم گردیدند. پس از ۴ پاساژ مکرر، سلول های استرومایی یکدست در کف فلاسک باقی ماند(۱۵).

تایید ماهیت سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با روش فلوسیتومتری:

در روش فلوسایتومتری، نمونه که در حقیقت یک سوسپانسیون سلولی در بافر فسفات به همراه ۲ درصد FBSاست به درون مایعی دیگرکه معمولا بافر یا آب است با نام مایع غلافی تزریق شد. در حین آماده سازی نمونه برای انواع آزمایشات فلوسایتومتری، سلول ها توسط رنگ های فلورسانس نشاندار شدند و سپس درون دستگاه در جریان مایع قرار گرفتند و به محل برخورد نور حاصل از منبع نوری رسیدند. زمانیکه سلول از مقابل پرتوی لیزر عبور کرد یک پالس با ارتفاع، پهنا و سطح زیر نمودار مشخصی ایجاد شد. مارکر های CD31,CD45 بعنوان مارکرهای منفی و CD44,CD73,CD90بعنوان مارکرهای مثبت برای سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان توسط روش فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفته شدند (۱۶, ۱۷).

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به نوروسفر:

در این مرحله سلول ها بعد از پاساژ چهارم با درصد بالای ۹۸ درصد سلول های زنده (تایید شده با تست تریپان بلو Trypan blue exclusion Test) انتخاب شدند. سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان تحت تاثیر محیط القایی عصبی به نوروسفر تبدیل شدند. برای این منظور سلول ها در پاساژ چهارم تریپسینه شدند و بعد از تعیین درصد سلول های زنده توسط رنگ حیاتی تریپان بلو ۰/۴ درصد به پلیت‌های شش خانه نچسب منتقل شدند ( ۵۰۰ هزار سلول در هر خانه) و توسط محیط DMEM/F12 با ترکیبی از EGF, 2% B27 و bFGF به



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06 ]

[ DOI: 10.61186/sjku.28.1.1 ]

میزان ۲۰ نانوگرم در میلی لیتر کشت داده شدند. برای این منظور پلاک سلولی به دست آمده بعد از سانتریفوژ سلول های تریپسینه شده با ۲۰۰ میکرولیتر از محیط نوروسفر کاملا پیپتاژ شد و در هر خانه ۴۰ میکرولیتر سوسپانسیون ریخته شد و در مرحله بعد ۱۵۰۰ میکرولیتر از محیط DMEM/F12 به هر خانه اضافه شد. هر ۲ الی ۳ روز ۵۰۰ میکرولیتر محیط نوروسفر جدید به نمونه ها اضافه شد. بعد از ۶ الی ۷ روز و تجمع سلول ها کنار هم به منظور بررسی و تایید نوروسفر ها از لحاظ ایمونوسیتوشیمی به لامل های ژلاتینه انتقال داده شد(۱۸-۲۰).

تایید ماهیت نوروسفربا ایمونوسیتوشیمی:

برای بررسی مارکرهای اختصاصی نوروسفر مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۶ الی ۷ روز بعد از تشکیل اسفرها، آنها به پلیت هایی که توسط لامل ژلاتینی پوشیده شده بودند با مقدار کمی محیط حاوی FBS منتقل شدند و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند و سپس محیط کشت حاوی FBS به آنها اضافه شد و در انکوباتور به مدت ۶ ساعت قرار داده شد. سپس اسفرهای چسبیده روی سطح لامل سه مرتبه با PBS و هر بار به مدت ۲ دقیقه شستشو داده شدند. در مرحله بعد سلول ها توسط پارافرمالدهید ۴ درصد برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه فیکس شدند. به منظور رنگ آمیزی عناصر سیتوپلاسمی غشاء سلول ها توسط تریتون ۰/۳ درصد برای مدت ۳۰ دقیقه نفوذپذیر شدند. سپس با اضافه کردن سرم بز ۱۰ درصد برای مدت ۲۰ دقیقه از واکنش های غیر اختصاصی جلوگیری شد. سپس برای مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه در معرض آنتی بادی های اولیه به شرح زیر قرار داده شد.

Mouse Anti- Neurofilament 68 monoclonal antibody (1/100 - 1/500; abcam)

Rabbit Anti-Oct4, polyclonal antibody(1/500; abcam)

Rabbit Anti-SOX2, polyclonal antibody(1:500; abcam)

Mouse Anti-Nestin, monoclonal antibody(1/500; abcam)

برای جلوگیری از خشک شدن آنتی بادی، نمونه ها در محفظه مرطوب قرار داده شدند. در ادامه بعد از ۱۲ ساعت آنتی‌بادی اولیه با PBS شستوشو داده شد و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و محیط تاریک در معرض آنتی بادی ثانویه Anti- Mouse کونژوگه با FITC و آنتی بادی ثانویه Anti- Rabbit کونژوگه با PE با غلظت ۱/۲۰۰ قرار گرفتند. برای مشخص شدن هسته سلول ها از DAPI یا PI با غلظت ۱ میلی گرم در ۱۰۰۰ میکرولیتر به مدت ۱ دقیقه استفاده شد. جهت بررسی سلول های مثبت، نمونه ها با توسط میکروسکوپ فلورسانس اینورت با بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند(۱۸).

تمایز نوروسفرها به سلول های بنیادی عصبی:

بعد از تشکیل نوروسفر به مدت ۷-۱۰ روز ، اسفرهای معلق ایجاد شده، پیپتاژ و به پلیت های ۶ خانهمخصوص کشت سلول منتقل شدند. در این حالت از محیط کشت نوروسفر به همراه ۵ درصد FBS استفاده شد. سلول های بنیادی عصبی تا پاساژ ۳ کشت داده شدند.

تایید ماهیت سلول های بنیادی عصبی با ایمونوسیتوشیمی:

سلول های بنیادی عصبی تولید شده بعد از ۳ پاساژ از کف فلاسک جدا شدند و از نظر مارکرهای اختصاصی عصبی مورد بررسی قرار گرفتند، به این منظور سلول ها بعد از تریپسینه شدن و جدا شدن از کف فلاسک به پلیت های پوشیده شده با لامل های ژلاتینه منتقل شدند و بعد از پر شدن کف پلیت این سلول ها برای انجام ایمونوسیتوشیمی انتخاب شدند. ابتدا محیط سلول ها دور ریخته شد و با فسفات بافر سالین (PBS) سه مرتبه به مدت ۵ دقیقه شستشو شدند. سپس توسط پارافرآلدهید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه فیکس شدند. سپس غشاء سلول ها توسط تریتون ۰/۳ درصد برای مدت ۳۰ دقیقه در یک ظرف مرطوب نفوذپذیر و در مرحله بعدی برای جلوگیری از واکنش های غیر اختصاصی سطح رویی سلول ها با سرم بز ۱۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه پوشش داده شد، درنهایت، به منظور ایجاد نفوذپذیری غشاء از تریتون (Triton x-100) استفاده شد. سپس به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06 ]

[ DOI: 10.61186/sjku.28.1.1 ]

سلسیوس در معرض آنتی بادی های اولیه به شرح زیر قرار گرفت (۲۱).

Mouse Anti-Neurofilament 68 monoclonal antibody (1/100 - 1/500;abcam)
Rabbit Anti-Oct4, polyclonal antibody(1/500; abcam)
Rabbit Anti-SOX2, polyclonal antibody(1:500; abcam)
Mouse Anti-Nestin, monoclonal antibody(1/500; abcam)

نحوه کپسولدار کردن سلول ها در هیدروژل آلژینات:

ابتدا شمارش سلولی انجام شد و سپس $10^6$/ml سلول با محلول آلژینات تهیه شده ترکیب شد و سوسپانسیون سلول و آلژینات حاصل شد. درنهایت برای قطره گذاری و ساخت هیدروژل از سرنگ باGage ۲۱ استفاده شد؛ و سپس قطره گذاری با فاصله ۶ اینچ از سطح محلول در پلیت های ۳ سانتی متری محتوی حمام کلسیم استریل شده حاوی کلسیم کلراید50mM و سدیم کلراید140mM انجام شد قطره‌های هیدروژل محتوی سلول‌ها توسط سرنگ در داخل حمام کلسیم رها شدند و بعد از گذر ۵ دقیقه قطره ها به صورت Bead از محلول خارج شدند و با بافر تریس دو مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه شست وشو داده و به محیط کشت با ۱۰ درصد سرم منتقل و در شرایط استریل به انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس با ۵٪ $CO_2$ و ۹۵٪ رطوبت منتقل شدند(۲۲).

آزمایش MTT جهت تعیین میزان تکثیر و بقای سلولی:

به جهت بررسی میزان تکثیر و بقای سلول های انکپسوله در هیدروژل آلژینات و سلول های گروه شاهد از این آزمایش استفاده شد. ابتدا ۵۰۰۰ سلول مورد مطالعه جهت ارزیابی میزان بقاء و انجام مقایسه بین گروه های دو بعدی و سه بعدی در کف پلیت های ۹۶ ول قرار داده و به مدت ۱، ۳ و ۷ روز کشت داده شدند. در زمان های مقرر محیط کشت رویی برداشته شد و سپس محلول استوک MTT-10X با محیط کشت بدون فنول رد تا ۱۰ برابر رقیق و به میزان ۱۵۰ میکرولیتر بر روی هر ول ریخته و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد و پس از گذر ۴ ساعت انکوبیشن محلول MTT از روی چاهک ها برداشته شد و بر روی هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyi sulfoxide)ریخته شد، بعد از تبدیل کریستال های بنفش رنگ به فرم محلول در DMSO در کمتر از ۱۰ دقیقه میزان جذب نور توسط دستگاه الایزاریدر و در طول موج ۵۷۰ نانومتر بررسی شد. میزان رشد سلول ها بر اساس میانگین جذب نور محاسبه و نمودار آن رسم گردید(۲۳).

بررسی کیفی میزان تکثیر و بقای سلولی با رنگ آمیزی آکریدین اورنج و پروپیدیوم یداید:

به منظور بررسی کیفی بقای سلول های کشت شده در هیدروژل آلژینات و مقایسه با گروه کنترل پس از مجاورت با رادیکال های آزاد و در شرایط بدون حضور رادیکال های آزاد از رنگ آمیزی با استفاده از آکریدین اورج و پروپیدیوم یداید (Acridin Orang/Propidium Iodide) استفاده شد. ابتدا محیط رویی سلول ها تخلیه و با PBS شست وشو داده شد. و سپس ۲۰ میکرولیتر محلول رنگ آکریدین اورنج (0.1 mg/ml)/ پروپیدیوم آیداید (0.001 mg/ml) بر روی سلول ها ریخته شد و سریعا توسط میکروسکوپ فلورسنت مشاهده گردید.سلول های زنده به علت حضور رنگ آکریدین اورنج به رنگ سبز و سلول های مرده بعلت پروپیدیوم یداید به رنگ قرمز دیده شدند (۲۴).

بررسی میزان تورم هیدروژل (swelling Ratio) :

به منظور بررسی میزان قوام و ماندگاری هیدروژل تهیه شده از این روش استفاده شد. ابتدا هیدروژل ها بدون سلول تهیه می‌شوند و سپس در همان شرایط کشت، وزن آن ها اندازگیری می‌شود. ابتدا وزن اولیه هیدروژل ها اندازگیری شد و سپس در محیط کشت DMEM/F12 با ۱۰٪ FBS در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند و سپس وزن هیدروژل ها هر ۵ دقیقه تا زمانی که وزن آنها ثابت شوند اندازگیری شد، نمودار آن رسم شد، بدین منظور این روش استفاده می شود که میزان تخلخل هیدروژل برای



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06 ]

[ DOI: 10.61186/sjku.28.1.1 ]

تمایز سلول های بنیادی عصبی به سلول های شبه نورونی :

به منظور تمایز سلول های بنیادی عصبی به سمت سلول های شبه نورونی، از سلول های پاساژ ۳ استفاده گردید. تعداد $10^6$ سلول شمارش شد و بعد از تهیه سوسپانسیون سلولی در محلول آلژینات و کپسولدار کردن سلول ها از محیط تمایزی جهت تمایز این سلول ها استفاده شد.

برای تمایز سلول ها از محیط DMEM/10% FBS به همراه یک میلی مولار والپروئیک اسید (VA) استفاده شد. همچنین گروه کنترل در شرایط دو بعدی تحت تاثیر محیط تمایزی در پلیت های ۱۲ خانه ای کشت داده شدند و از نظر میزان تمایز با گروه سه بعدی مقایسه شدند (۲۵).

تایید ماهیت سلول های شبه نورونی:

برای تایید ماهیت سلول های شبه نورونی از روش PCR جهت بررسی بیان ژن های مارکر های عصبی استفاده شد . در این روش میزان بیان NF200, Neurogenin, Nestin Neuro Dبا روش PCR بررسی شد و از GAPDH بعنوان ژن رفرنس استفاده شد، پرایمرها طبق جدول ۱ مورد استفاده قرار گرفتند.

اندازگیری ظرفیت آنتی اکسیدان کل (TAC):

به منظور بررسی میزان آنتی اکسیدان در سلول های کشت شده در هیدروژل آلژینات و مقایسه با گروه دوبعدی از تست FRAP assay استفاده شد.

۱/۵ میلی لیتر محلول کار FRAP (50mL acetate buffer 300mM,10mL $FeCl_3$ 40mM,TpTz 10mM) در یک لوله آزمایش ریخته شد؛ ۵۰ میکرولیتر از نمونه استاندارد ($FeSO_4$ در غلظت های ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵و ۰ میلی مولار) به آن افزوده شد و کاملا ورتکس گردید. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد جذب نور کلیه نمونه ها در طول موج 593nm خوانده شد و میزان FRAP در نمونه های مجهول براساس نمودار استاندارد محاسبه شد.

جهت بدست آوردن میزان FRAP در نمونه مجهول سلول های مورد مطالعه ابتدا از کف ظرف کشت جدا شدند و با 1200 RPM به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و بر روی پلاک تشکیل شده، ۲۰۰ میکرولیتر Triton X-1000.5 درصد ریخته شد و با پیپتاژ خوب مخلوط گردید. به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد و هر ۵ دقیقه پیپت شد و سپس با استفاده از دستگاه سونیکت ( با فرکانس ۵۰ Hz، دامنه ۸۰، نیم سیکل در ثانیه) سلول ها شکسته شدند و با دور ۱۲۰۰۰RPM به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ شد از سوپ رویی که حاوی شیره سلول ها بود، برای انجام تست ها استفاده گردید؛ تمام این مراحل برای ۴ گروه مورد مطالعه انجام شد؛ (سلول های کشت شده در محیط دو بعدی و سه بعدی که هر کدام در دو گروه تیمار شده با $H_2O_2$ و کنترل بودند) (۲۶).

اندازگیری میزان ROS:

محلول DCF-DA ۵ میکرومولار در بافر تریس ۴۰ میلی مولار به صورت روزانه تهیه شد و مخلوط تا قبل از استفاده در یخ و در جای تاریک نگه داشته شد.

سلول های کشت شده در شرایط دو بعدی با EDTA/ تریپسین از کف پلیت جدا شدند و سلول های کشت شده در شرایط سه بعدی نیز با هیدروژل ها برداشته شدند و هر دو گروه به ۱ میلی لیتر محلول DCHF-DA ۵ میکرومولار در بافر تریس اسیدی ۴۰ میلی مولار منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند و سپس به مدت ۱ دقیقه در ۵۰ وات سونیکت شدند، سپس بمدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شدند و فلورسنت در سوپرناتانت با استفاده از اسپکتروفلورومتری با excitation 488nm و emission 525 nm اندازگیری و ثبت شد، و میزان ROS در گروه های مختلف با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمد.

غلظت های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میکرومولار $H_2O_2$در بافر تریس اسیدی آماده شد، سپس ترکیب فلورسنتی DCF-DA و تعداد برابری از سلول ها اضافه شد. میزان شدت فلورسنتی با استفاده از اسپکتروفلورومتر اندازگیری شد و منحنی استاندارد رسم شد.



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06 ]

[ DOI: 10.61186/sjku.28.1.1 ]

بررسی آپوپتوز با روش RT-PCR:

به منظور بررسی آپوپتوز در گروه های مورد مطالعه ژن های BAX, $bcl_2$, Survivin ( پرایمرهای مورد نظر طبق جدول ۲) به عنوان ژن های ارزیابی کننده آپوپتوز و GAPDH به عنوان ژن رفرنس مورد ارزیابی قرار گرفتند. ابتدا سلول های مورد مطالعه له شدند و ۱ میلی لیتر از محلول استخراج RNA (Trizol reagent;Invitrogen, Germany) به میکروتیوب حاوی سلول ها اضافه شد. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون بر روی یخ ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به محلول اضافه شد و ۱۵ ثانیه تکان داده شد و سپس در دمای ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه و با دور 12000 RPM سانتریفوژ شد، سه فاز تشکیل شده و فاز رویی که شفاف بود محتوی RNA برداشته شد و با حجم برابر ایزوپروپانول مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در همین دما با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. به رسوب تشکیل شده اتانول ۷۰ درصد اضافه شد و پس از انجام ورتکس به مدت ۸ دقیقه با دور ۷۵۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. پس از خشک شدن الکل به رسوب تشکیل شده ۲۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC ( 0.1 درصد) افزوده و پس از سانتریفوژ کوتاهی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گرادانکوبه شد و سپس در فریزر ۸۰- نگهداری شد سپس به منظور از بین بردن آلودگی احتمالی RNA با DNA از آنزیم DNaseعاری از RNase استفاده شد و DNA Treatment انجام شد و پس از بررسی درجه خلوص و غلظت RNA سنتز cDNA بر طبق پروتکل شرکت سازنده (Fermentase,USA) انجام گرفت و سرانجام واکنش RT-PCR با مخلوط کردن ۱۰ میکرولیتر Master Mix 2X(Ampliqon) و ۲۵ نانوگرم cDNA و پرایمرهای Forward و Reverse با استفاده از دستگاه Thermal cycler ( Biorad) صورت گرفت (۲۷).

تجزیه و تحلیل آماری:

نتایج حاصل از این مطالعه توسط نرم افزار کامپیوتری SPSS (SPSS. Ink, V16, 2016 USA) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. به این ترتیب، نتایج بررسی میزان ROS و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و نتایج تست های مولکولی PCR و همچنین داده های مربوط به بررسی بقا سلول ها در گروه های مورد بررسی با استفاده از تست آماری One Way Anova مورد تحلیل قرار گرفت و تفاوت میانگین ها در سطح $P\leq0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد .

نتایج حاصل از سه تکرار بوده و به صورت میانگین ± انحراف معیار (SD) بیان گردید. سطح معنی داری ($P \leq 0.05$) در نظر گرفته شد. همچنین بین میانگین غلظت آنتی اکسیدانی کل و میزان ROS درون سلولی آزمون همبستگی استفاده شد.

## یافته ها

بررسی های مورفولوژی سلول ها:

نمونه مغز استخوانی که تازه از دیافیز استخوان های فمور و تیبیا به داخل فلاسک تخلیه شده شامل مجموعه ای از سلول های بنیادی مزانشیمی و خون ساز است. ولی به دنبال پاساژهای مکرر، از تعداد سلول های رده خونی کاسته و به سلول های استرومایی افزوده شده است، زیرا که این سلول ها به کف فلاسک می چسبیدند. آنها را می توان به سه فرم دوکی شکل و کشیده، مسطح و پهن با زوائد سلولی متعدد، گرد و کوچک و در حال تکثیر مشاهده کرد. در پاساژهای بالاتر عمده سلول های باقی مانده در کف فلاسک از نوع استرومایی بودند که سلول ها، دوکی شکل و شبه فیبروبلاستی می باشند. و در پاساژهای بالاتر سلول ها کاملا دوکی شکل دیده می شوند.

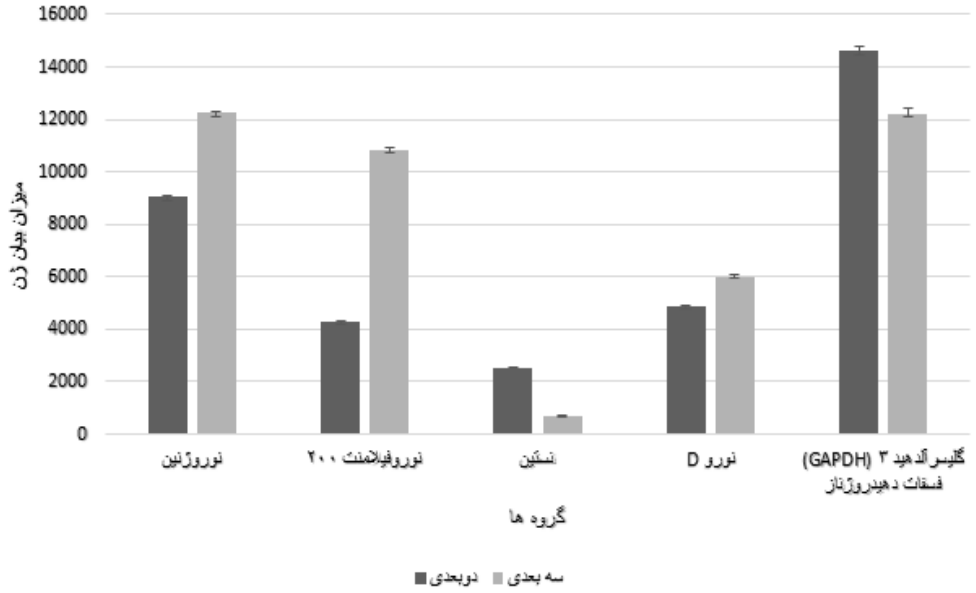
سلول های بنیادی مزانشیمی بعد از قرار گرفتن در محیط کشت القائی عصبی توانایی تشکیل نوروسفر را دارند. سلول های بنیادی مزانشیمی طی ۵ الی ۶ روز بعد از مجاورت با محیط تمایزی عصبی در کنار هم جمع شده و ساختارهای



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06 ]

[ DOI: 10.61186/sjku.28.1.1 ]

شناور و کروی شکل با هسته نامشخص ایجاد می کنند کـه بـه این اسفرها، نوروسفر گفته می‌شود. قطـر اسـفرها در روز اول حدودا ۱۰۰ میکرومتر بوده که از تعداد کمی سـلول تشـکیل شده است و از روز اول تا سوم تعداد اسفرها افزایش می‌یابـد و سـپس از روز سـوم تـا هفـتم از تعـداد آنهـا کاسـته و بـه قطرشان افزوده می‌شود که حدودا در روز هفتم بـه قطـر ۲۰۰ میکرومتر می‌رسند. همچنین در ایـن مطالعـه نشـان داده شـده است که بعد از انتقال نوروسفرها به فلاسک های بچسـب بـه کـف فلاسـک چسـبیده و بـه شـکل سـلول هـای کشـیده و دوقطبی دیده مـی‌شـوند، سـلول هـای بنیـادی عصـبی نامیـده می‌شوند(مطابق شکل ۱ ).




شکل ۱. بررسی میزان بیان ژن های شبه نورونی با استفاده از روش وا کنش زنجیره ای پلی مرازی در گـروه هـای مـورد مطالعـه پـس از تمـایز در محـیط دو بعدی و سه بعدی، بیان ژن های نوروژنین و نوروفیلامنت ۲۰۰ در گروه سه بعدی به طور قابل ملا حظه ای از گروه دوبعدی بیشتر است و میزان بیان ژن نستین در گروه دو بعدی بالاتر است ژن خانه دار گلیسرآلدهید۳ فسفات دهیدروژناز ( GAPDH) در دو گروه بررسی شده است.

تایید ماهیت سلول ها:

به منظور بررسی ماهیت اسـترومایی سـلول هـای چسـبیده بـه کـف فلاسـک و تاییـد منشـا مزانشـیمی آنهـا از روش فلوسـیتومتری اسـتفاده شـد(مطابق شـکل ۲)، بـه ایـن منظـور سلول ها در پاساژ چهارم مورد بررسـی قـرار گرفتنـد؛ مـارکر سـطحی سـلول هـای هماتوپوئیتیـک (3.13%)CD45 و مارکر سطحی سلول های اندوتلیال (2.96%)CD31 منفـی شـدند امـا مارکرهـای سـلول هـای بنیـادی مزانشـیمی CD44(%75.74), CD73(%98.37) و CD90 (77.17%) مثبت شـدند. جهـت تاییـد صـحت انجـام روش فلوسایتومتری، گـروه کنتـرل بـا آنتـی بـادی هـای ایزوتایـپ کونژوگه با FITCو PE انجام شد،(مطابق شکل ۳).

و برای تایید ماهیت نوروسفرها و سلول هـای بنیـادی عصـبی نیز از روش ایمونوسیتوشـیمی(مطابق شـکل ۴) اسـتفاده شـد بررسی ایمونوسیتوشیمی نوروسفرها بعـد از روز ۷ نشـان داد که این سـاختارها مارکرهـای عصـبی نسـتین و نوروفیلامنـت هـای ۶۸ و همچنـین مـارکر هـای سـلول هـای بنیـادی نظیـر $SOX_2$ و $OCT_4$را بیان مـی کننـد و همچنـین بررسـی سـلول های بنیادی عصبی نیز بیان مارکر هـای نسـتین، نوروفیلامنـت ۶۸، $OCT_4$ و $SOX_2$ را (مطـابق شـکل ۵ ) نشـان مـی‌دهنـد. هسته سلول ها با PI و DAPI رنگ آمیزی شـد. تاییـد تمـایز سلول های بنیادی عصبی به سلول های شـبه نـورونی در طـی یک هفته با ۱ میلی مولار والپروئیک اسید، با بررسـی بیـان و یـا عـدم بیـان ژن هـای Nestin، NF200، Neuro d،



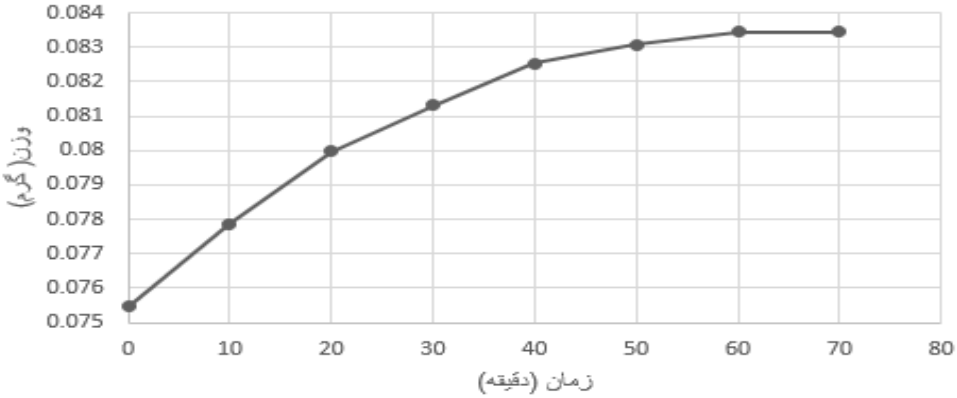
[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06 ]

[ DOI: 10.61186/sjku.28.1.1 ]

Neurogenin با روش RT_PCR (مطابق شکل ۶ و نمودار۱ ) انجام شد، ژن GAPDH بعنوان ژن Housekeeping بررسی شد.

بررسی تورم هیدروژل آلژینات:

همانگونه که گفته شد، به منظور آگاهی از میزان قوام هیدروژل و ظرفیت آن برای تورم از این تست استفاده شد که در نمودارشماره ۲ آورده شده است.




شکل ۲. بررسی میزان تورم هیدروژل، به منظور آگاهی از میزان قوام هیدروژل و ظرفیت آن برای تورم از این تست استفاده می شود، که نشان می دهد چه مدت زمانی طول می کشد تا تمام منافذ آن پر شود و زمانی که وزن نمونه ثابت شود و تغییر نکند نشان دهنده آن است که در اینجا بعد از ۶۰ دقیقه وزن نمونه ثابت شده است .

بررسی بقای سلول ها:

به منظور بررسی بقای کیفی سلول های کپسول شده در هیدروژل آلژینات از رنگ آمیزی آکریدین اورنج و پروپیدیوم یداید (Acridin Orang/Propidium Iodide) استفاده شد و در شکل ۷ آورده شده است، تعدادی از سلول ها در روز اول همانطور که در شکل مشخص است بدلیل تنش هایی که در طی آماده سازی به سلول ها وارد می شود مرده اند و به رنگ قرمز دیده می شوند ولی بعد از روز سوم میزان بقا و تکثیر سلول افزایش یافته و همه سلول ها زنده هستند همانطور که در شکل دیده می شود . همچنین به منظور بررسی بقای کمی سلول ها از MTT استفاده شد در این روش سلول ها در روزهای اول، سوم و هفتم مورد بررسی قرار گرفتند و با گروه کنترل مقایسه شدند و همانطور که در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است میزان بقا و تکثیر سلول ها در کپسول نسبت به دوبعدی بیشتر بوده است.

بررسی میزان استرس اکسیداتیو:

سلول های بنیادی عصبی در ۴ گروه مورد مطالعه، پس از گذشت دوره تیمار، توسط سونیکیت لیز شدند و میزان ROS درون سلولی آن ها توسط اسپکتروفلوریمتری اندازگیری گردید. میزان بازتابش فلورسنت DCF ( نشان دهنده میزان ROS درون سلولی) مطابق نمودار شماره ۴ در گروه سه بعدی بدون مجاورت با $H_2O_2$، پایین ترین میزان (۰) بود و گروه دو بعدی تیمارشده با $H_2O_2$ (۲۳/۲۳) بالاترین میزان بود.

بررسی میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی کل:

به منظور بررسی میزان آنتی اکسیدان در سلول های کشت شده در هیدروژل آلژینات و مقایسه با گروه دوبعدی از تست FRAP assay مطابق نمودار ۵ استفاده شد. غلظت آنتی اکسیدان کل برای گروه های مختلف مورد مطالعه با استفاده از نمودار استاندارد اندازگیری شد ، که بالاترین غلظت مربوط به گروه کشت سه بعدی بدون مجاورت با $H_2O_2$ و پایین ترین غلظت مربوط به گروه کشت دو بعدی تیمارشده با $H_2O_2$ بود.

بررسی آپوپتوز با روش RT-PCR:

به منظور بررسی آپوپتوز در گروه های مورد مطالعه ژن های BAX, $bcl_2$, Survivin مورد مطالعه قرار گرفتند و مطابق شکل ۸ در گروه های سه بعدی و دو بعدی بدون



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06 ]

[ DOI: 10.61186/sjku.28.1.1 ]

مجاورت با $H_2O_2$ژن های Survivin ,$bcl_2$ بیان شدند و ژن BAX بیان نشد و در گروه سه بعدی تیمار شده با $H_2O_2$فقط ژن $bcl_2$ بیان شده و ژن های Survivin ,

BAX بیان نشد، همچنین در گروه دوبعدی با $H_2O_2$ ژن BAX بیان شد و ژن های Survivin ,$bcl_2$ بیان نشدند.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در RT- PCR برای تایید ماهیت سلول های شبه نورونی

| | | | |
|---|---|---|---|
| NF200 | Forward: CAGTCAGAGGAGTGGTT<br>Reverse: CTTGGTGCTTTTCAGTGC | 156 | 50.0<br>48.5 |
| Neurogenin | Forward: CCTGTCCAGTTT CCTCACC<br>Reverse: GCTCCTGCTCTTCGTCCT | 149 | 55.3<br>56.9 |
| Nestin | Forward: GAGGTCCCAGTTGCTCAGTC<br>Reverse: TAGCCCTACCACTTCCTGCT | 147 | 60.04<br>59.96 |
| NeuroD1 | Forward: AGCCCCCTAACTGATTGC<br>Reverse: CACCCGAGGAGAAGATTG | 192 | 60.03<br>60.46 |

جدول ۲. پرایمرهای مورد استفاده در RT- PCR به منظور بررسی آپوپتوز

| نام | توالی | اندازه | دما |
|---|---|---|---|
| Bcl2 | FORWARD:<br>TGGGATGCCTTTGTGGAA<br>REVERSE:<br>TCTGCTGACCTCACTTGT | 148 | 56.29<br>55.3 |
| SURVIVIN | FORWARD:<br>TTACAGGAGACCGTGACA<br>REVERSE:<br>AAAGCCACAAAACCAAAGAG | 104 | 54.68<br>54.88 |
| BAX | FORWARD:<br>GTCCTCACTGCCTCACTCAC<br>REVERSE:<br>CTTTCCCCGTTCCCCATTCA | 121 | 60. 04<br>59.96 |
| GADH | FORWARD:<br>CATACTCAGCACCAGCATCACC<br>REVERSE:<br>AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG | 121 | 61.3<br>61.5 |

جدول ۳ . بررسی میانگین غلظت آنتی اکسیدان ها و میزان ROS درون سلولی و رابطه میان آن دو در گروه های مورد مطالعه

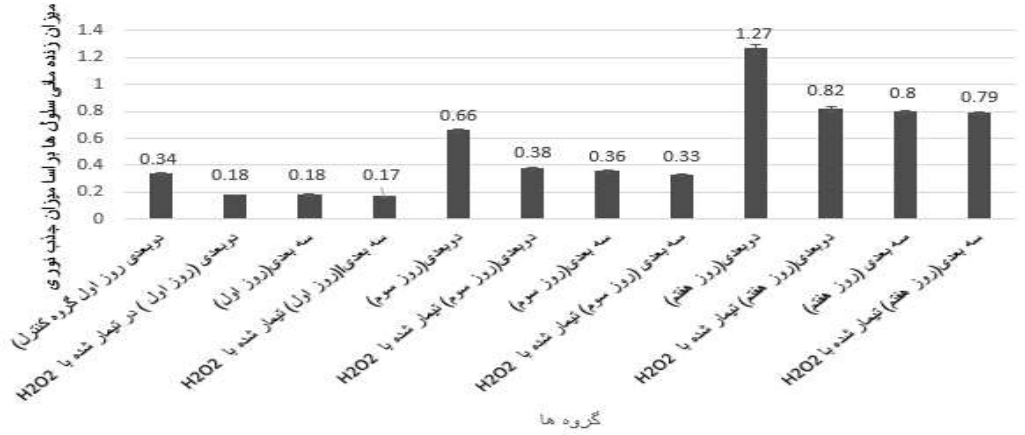
| گروه ها | میانگبن غلظت آنتی اکسیدان های محلول | میانگین غلظت ROS درون سلولی | رابطه میان میزان آنتی اکسیدان ها و ROS |
|---|---|---|---|
| دوبعدی | $281\pm38^{a}$ | $20.07112\pm0.03^{\alpha}$ | -0.977 |
| دوبعدی پس از تیمار با H2O2 | $108\pm17^{b}$ | $23.23018333333\pm0.06^{\beta}$ | -0.956 |
| سه بعدی | $474\pm63^{c}$ | $0.0^{\gamma}$ | -1 |
| سه بعدی پس از تیمار با H2O2 | $209\pm27^{a}$ | $15.85989333333334\pm0.02^{\delta}$ | -0.881 |



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06 ]

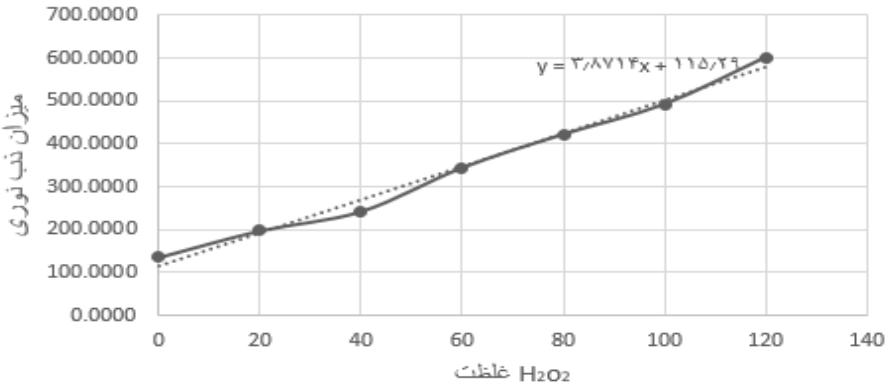
[ DOI: 10.61186/sjku.28.1.1 ]

حروف لاتین و حروف یونانی تفاوت معنادار ($P \leq 0.05$) بین گروه ها را نشان می‌دهد. اعداد به صورت میانگین ± انحراف معیار (SD) بیان شده است




شکل ۳. بررسی کمی بقای سلول ها ی کپسوله شده در هیدروژل آلژینات پس از مجاورت با پراکسید هیدروژن و بدون حضور پراکسیدهیدروژن و مقایسه با گروه کنترل با روش MTT . در اینجا بیش ترین بقا سبلول ها مربوط به کشت دوبعدی بدون تیمار با $H_2O_2$ و کمترین مربوط به دوبعدی تیمار شده با $H_2O_2$

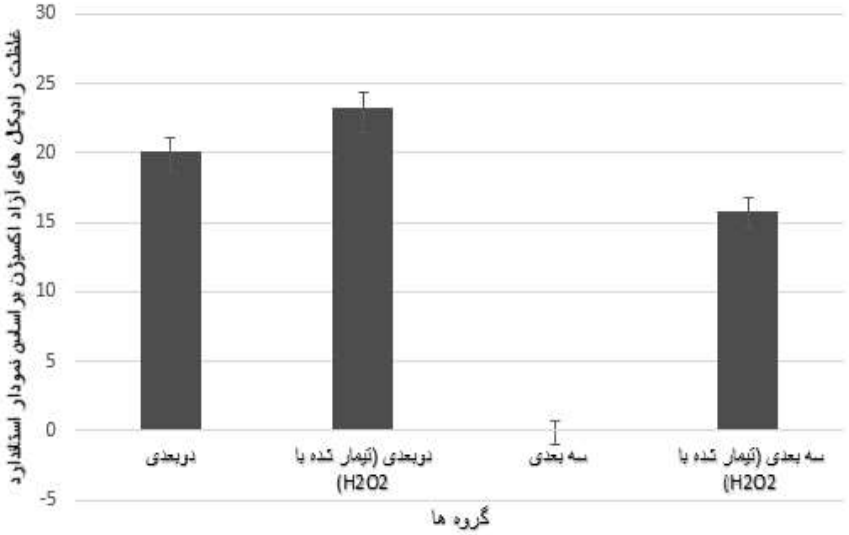
(الف)




(ب)

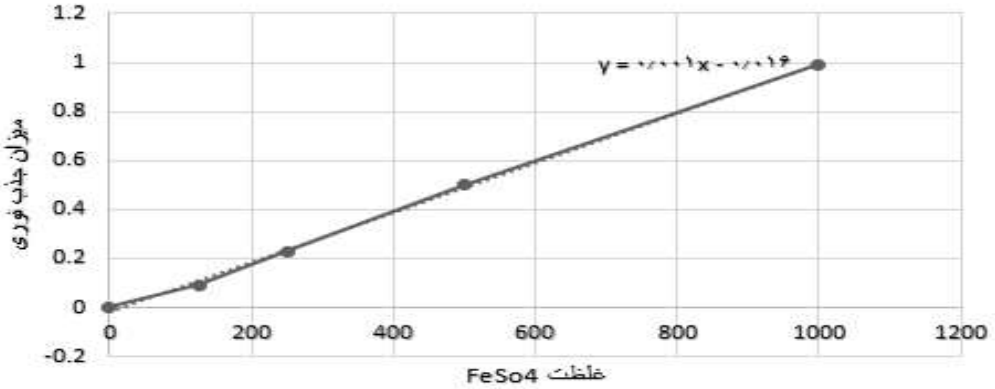
[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06 ]

[ DOI: 10.61186/sjku.28.1.1 ]

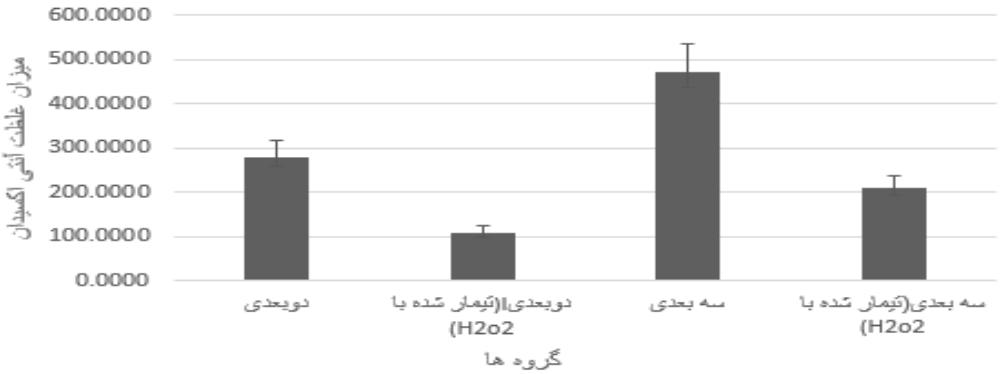



شکل ۴. اندازه گیری میزان ROS در گروه های مورد مطالعه،الف) نمودار استاندارد بر اساس غلظت های مختلف $H_2O_2$، ب) نمودار Extrupolated میزان ROS درون سلولی در گروه های مورد مطالعه که پس از گرفتن جذب نوری با استفاده از نمودار استاندارد میزان آن محاسبه شد

(الف)




(ب)

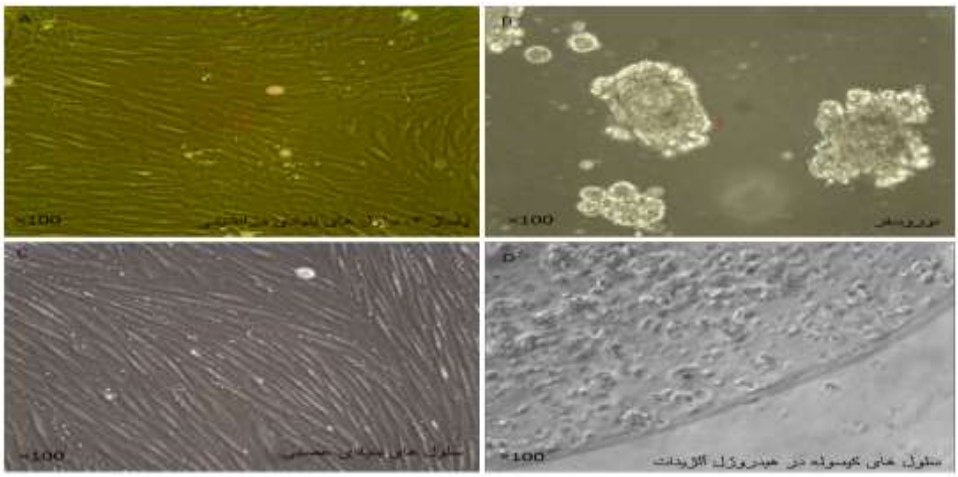



شکل ۵ . تستFRAPجهت اندازه گیری میزان آنتی اکسیدان کل. الف) نمودار استاندارد، ب) نمودار غلظت های آنتی اکسیدان کل در گروه های مورد مطالعه. میزان آنتی اکسیدان کل در هر ۴ گروه اندازگیری شد و از طریق نمودار استاندارد میزان آن محاسبه شد که گروه سه بعدی بخاطر خاصیت آنتی اکسیدانی هیدروژل پیشترین میزان را دارد.

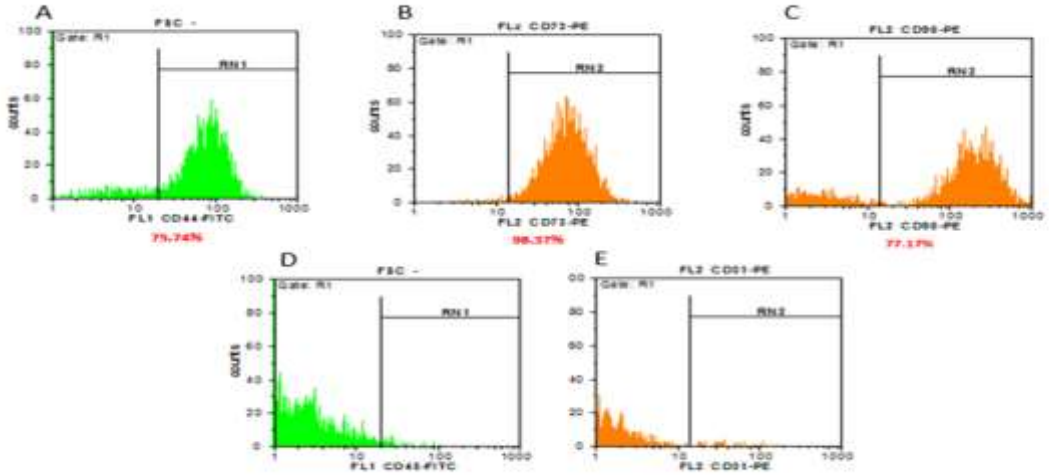


[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06 ]

[ DOI: 10.61186/sjku.28.1.1 ]

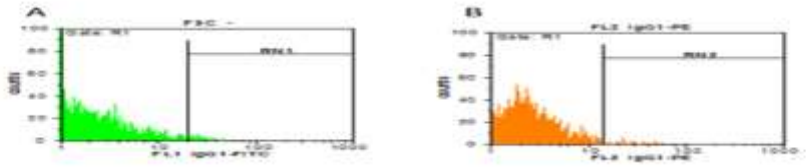


**شکل ۶. بررسی مورفولوژی سلول های مورد مطالعه. A) سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان کشت شده در محیط کشت B ،10%FBS/DMEM-F12) نوروسفرهای تشکیل شده در محیط تمازی از سلول های بنیادی مزانشیمی پس از ۷ روز کشت،C) سلول های بنیادی عصبی تشکیل شده از نوروسفر ها در محیط تمایزی، D) سلول های انکپسوله شده در هیدروژل آلژینات**



**شکل۷. تایید ماهیت سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان درپاساژ چهارم با روش فلوسیتومتری**

A) بیان مارکر سلول های بنیادی مزانشیمی CD44(%75.74) کونژوگه با FITC. B.بیان مارکر سلول های بنیادی مزانشیمی CD73(%98.37) کونژوگه با PE. C.بیان مارکر سلول های بنیادی مزانشیمی CD90(%77.17) کونژوگه با PE. D. عدم بیان مارکر هماتوپوئیتیکی،E) عدم بیان مارکر اندوتلیالی



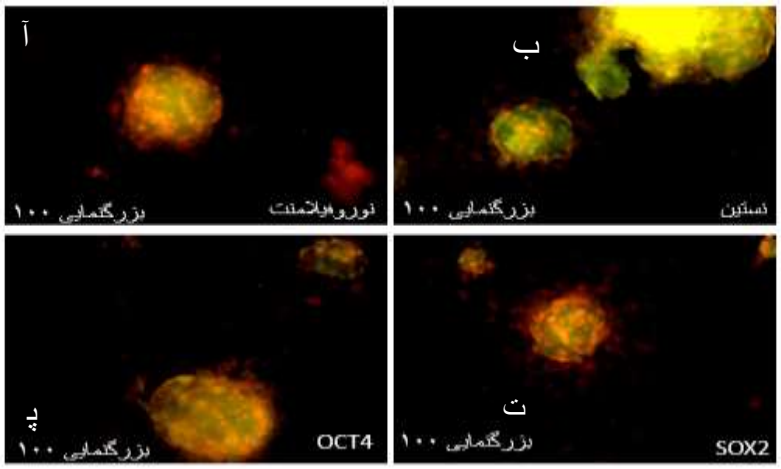
شکل ۸ کنترل FITC و PE. با روش فلوسایتومتری

A)کنترل با آنتی بادی‌های کونژوگه با FITC و B) کنترل با آنتی بادی های کنژوگه با PE



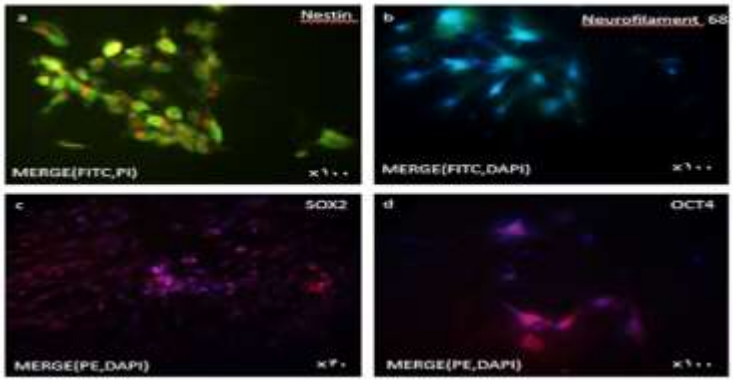
[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06 ]

[ DOI: 10.61186/sjku.28.1.1 ]



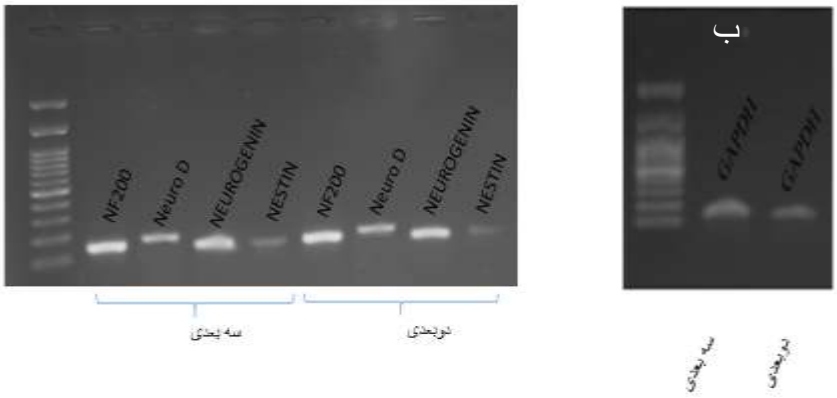

**شکل ۹. تایید ماهیت نوروسفرها با روش ایمونوسیتوشیمی**

آ )آنتی بادی نوروفیلامنت کونژوگه با FITC و رنگ آمیزی هسته با Pi، ب)آنتی بادی نستین کونژوگه با FITC و رنگ آمیزی هسته با Pi پ) آنتی بادی OCT4 کونژوگه با FITC و رنگ آمیزی هسته با Pi ت)آنتی بادی SOX2کونژوگه با FITC و رنگ آمیزی هسته با Pi




**شکل۱۰. تایید ماهیت سلول های بنیادی عصبی با روش ایمونوسیتوشیمی**

A) آنتی بادی نستین کونژوگه با FITC و رنگ آمیزی هسته با Pi، B) آنتی بادی نوروفیلامنت ۶۸کونژوگه با FITC و رنگ آمیزی هسته با Pi،C) آنتی بادی SOX2کونژوگه با FITC و رنگ آمیزی هسته با Pi،D) آنتی بادی OCT4کونژوگه با FITC و رنگ آمیزی هسته با Pi



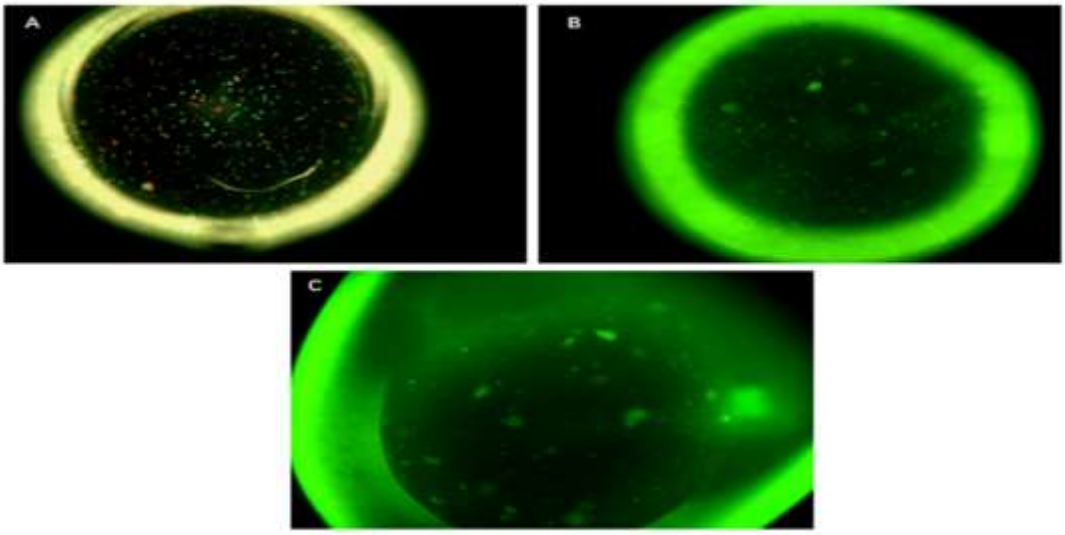

**شکل ۱۱. تایید ماهیت سلول های شبه عصبی با روش RT-PCR**

آ ) مقایسه بیان مارکر های نوروفیلامنت، Neuro D ، Neurogenin و نستین در شرایط دوبعدی و سه بعدی ب) بیان ژن های خانه دار GAPDH

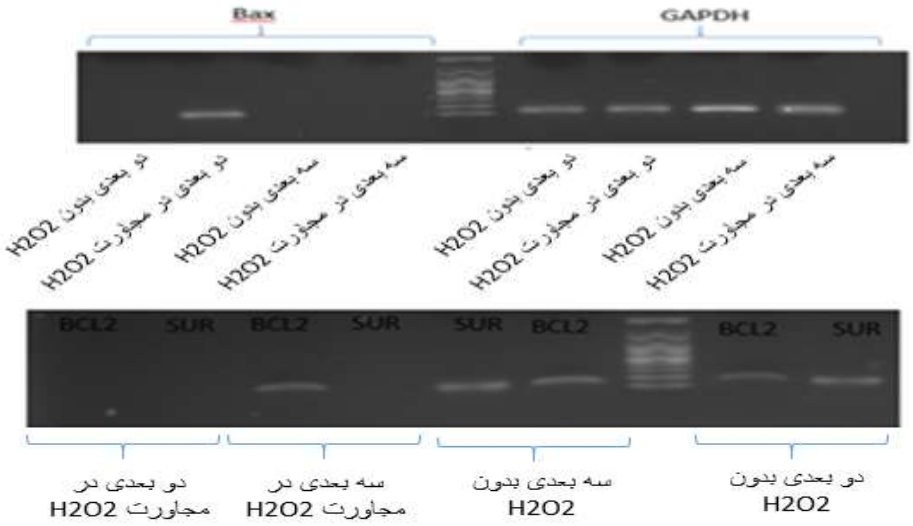


[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06 ]

[ DOI: 10.61186/sjku.28.1.1 ]




**شکل ۱۲. بررسی بقای کیفی سلول های انکپسوله در هیدروژل آلژینات. A) اولین روز کشت سلول های اکپسول شده در هیدروژل آلژینات،B) سومین روز کشت سه بعدی در هیدروژل آلژینات، C) روز هفتم کشت سه بعدی سلول ها در هیدروژل آلژینات**




**شکل۸. بررسی بیان ژن های آپوپتوزی در گروه های مورد مطالعه با روش** RT-PCR.

## بحث

نتایج حاصل از انداه گیری میزان ROS در گروه های مختلف توسط اسپکتروفلوریمتری نشان داد که میزان استرس اکسیداتیو سلول های کشت شده در شرایط دوبعدی پس از تیمار با $H_2O_2$ بالاترین و سلول های کشت شده در شرایط سه بعدی بدون حضور $H_2O_2$ پایین ترین میزان ROS را دارا می‌باشند. بررسی این نتایج گویای این مطلب است که آلژینات با دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و همچنین خاصیت حفاظتی باعث کاهش میزان ROS القا شده توسط $H_2O_2$ می‌شود.

همچنین نتایج حاصل از بررسی میزان آنتی‌اکسیدان های موجود در گروه های مختلف نشان داد؛ پایین ترین میزان غلظت آنتی‌اکسیدانی کل در سلول های کشت شده دوبعدی پس از تیمار با $H_2O_2$ و بالاترین میزان



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06 ]

[ DOI: 10.61186/sjku.28.1.1 ]

آنتی‌اکسیدان ها در گروه کشت سه بعدی بدون حضور $H_2O_2$ می‌باشند که با نتایج تست ROS هماهنگی دارد.
همچنین در این مطالعه چهار گروه جهت ارزیابی اثر $H_2O_2$ بعنوان یک رادیکال آزاد بر ایجاد آپوپتوز در سلول ها و مقایسه با سلول های حفاظت شده در هیدروژل آلژینات مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان دهنده ی ایجاد آپوپتوز در گروه کشت دو بعدی پس از مجاورت با رادیکال های آزاد و عدم ایجاد آپوپتوز در گروه کشت سه بعدی پس از مجاورت با رادیکال های آزاد است که نشان دهنده ی اثر حفاظتی هیدروژل آلژینات در مقابل رادیکال های آزاد و جلوگیری از آپوپتوز سلول ها می‌باشد. همچنین مطالعه و بررسی میزان بقاء سلول ها در ۴ گروه مورد مطالعه انجام شد که با مطالعه ای که در سال ۲۰۱۲ توسط Marina Matyash و همکاران انجام گرفته است هماهنگی داشته است [10]؛ در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۹ توسط Ghoe G و همکاران انجام شده نشان می دهد آلژینات که در این مطالعه به عنوان میکروژل استفاده شده می تواند فعالیت آنتی اکسیدانی را افزایش دهد که با مطالعه حاضر هماهنگی دارد(۲۸). در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۹ توسط Varini E و همکاران انجام شد تایید کننده این خاصیت است. همچنین در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۷ توسط Kerschenmeyer و همکاران انجام شده نشان می دهد آلژینات به صورت سولفاته می تواند فعالیت رادیکال های آزاد را کاهش دهد(۲۹).
در مطالعه حاضر که به منظور بررسی اثر حفاظتی هیدروژل آلژینات انجام شده است، جهت ارزیابی میزان بقاء سلول های کشت شده در شرایط سه بعدی از دو روش کمی و کیفی جهت مقایسه با گروه کنترل استفاده شده است. همانگونه که در نتایج نشان داده شد هر دو روش کمی و کیفی با یکدیگر همخوانی داشتند که نشان دهنده رشد مناسب سلول ها در شرایط سه بعدی و اثر حفاظتی هیدروژل در مقابل رادیکال های آزاد می‌باشد. اما بعلت آماده سازی اولیه سلول ها و کپسول دار کردن آنها تعدادی از سلول ها دچار مرگ سلولی شدند که کاهش بقا را در روز اول در گروه سه بعدی مشاهده کردیم. که در بررسی های کیفی سلول ها در روز اول کشت عده ای مرده( قرمز) و عده ای زنده (سبز) بودند که میزان جذب نوری در بررسی های کمی با تست MTT نیز نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داد. ولی افزایش چشمگیری در میزان بقاء سلول ها را در روز های ۳ و ۷ کشت گروه سه بعدی مشاهده کردیم که نشان دهنده ی رشد بهتر سلول ها در شرایط سه بعدی می‌باشد همچنین میزان بقاء در گروه سه بعدی پس از مجاورت با رادیکال های آزاد به طور معناداری بالاتر از گروه کنترل به دست آمد.
همچنین در این مطالعه سلول های بنیادی عصبی پس از کپسوله شدن در هیدروژل آلژینات با کمک والپروئیک اسید به سلول های شبه عصبی تمایز داده شدند همانطور که در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۴ توسط Khosravizadeh و همکاران انجام شد بیان مارکرهای عصبی $MAP_2$, GFAP , Nestin , در گروه کشت سه بعدی در هیدروژل آلژینات نسبت به شرایط دوبعدی به طور قابل چشمگیری بالاتر است و در مطالعه حاضر بیان مارکرهای Neurogenin و $NF_{200}$ در گروه کشت سه بعدی هیدروژل آلژینات نسبت به گروه کنترل به طور قابل ملاحظه ای بالاتر بود و بیان مارکر Neuro D تفاوت چشمگیری با گروه کنترل ندارد هم چنین بیان نستین برخلاف مطالعه ذکر شده در بالا در گروه کشت سه بعدی هیدروژل آلژینات نیز کمتر بود(۳۰). در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۸ توسط Sadegh ghorbani و همکاران انجام شد نشان داد والپروئیک اسید سبب تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های شبه عصبی و بیان ژن های Nestin، MAP2 ، NSE می شوند(۳۱).

## نتیجه گیری

هیدروژل آلژینات توانایی حفاظت از سلول ها را در مقابل رادیکال های آزاد دارد و می‌توان از آن بعنوان یک عامل حفاظتی در سلول درمانی استفاده کرد و با وجود مرگ اولیه ی سلول ها در طی کپسول دار کردنشان، می تواند از آپوپتوز سلول ها در مرحله سلول درمانی جلوگیری کند.



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06 ]

[ DOI: 10.61186/sjku.28.1.1 ]

همچنین این هیدروژل تقویت کننده اثر القایی والپروئیک اسید در تمایز سلول ها به سلول عصبی و بیان مارکرهای عصبی می باشد.

## تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته علوم تشریح است که با پشتیبانی مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. این مطالعه طی نامه 52/6587 به تاریخ 19.12.2015 به تایید کمیته اخلاق رسیده است. محل انجام پژوهش در آزمایشگاه گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسیده است؛ کمال قدردانی را نسبت به معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس اعلام میداریم. تعارض منافع برای نویسندگان جهت چاپ این مقاله وجود ندارد.

## منابع

1.Mahoney MJ, Anseth KS. Contrasting effects of collagen and bFGF-2 on neural cell function in degradable synthetic PEG hydrogels. Journal of biomedical materials research Part A. 2007;81(2):269-78.
2.Tatard VM, D'Ippolito G, Diabira S, Valeyev A, Hackman J, McCarthy M, et al. Neurotrophin-directed differentiation of human adult marrow stromal cells to dopaminergic-like neurons. Bone. 2007;40(2):360-73.
3.Xie X, Liu H, Wu J, Chen Y, Yu Z, De Isla N, et al. Rat BMSC infusion was unable to ameliorate inflammatory injuries in tissues of mice with LPS-induced endotoxemia. Bio-medical materials and engineering. 2017;28(s1):S129-S38.
4.Ye Y, Peng YR, Hu SQ, Yan XL, Chen J, Xu T. In Vitro Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Neuron-Like Cells by Cerebrospinal Fluid Improves Motor Function of Middle Cerebral Artery Occlusion Rats. Frontiers in neurology. 2016;7:183.
5.Wei L, Wei ZZ, Jiang MQ, Mohamad O, Yu SP. Stem cell transplantation therapy for multifaceted therapeutic benefits after stroke. Progress in neurobiology. 2017.
6.Onifer SM, Rabchevsky AG, Scheff SW. Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery. ILAR journal. 2007;48(4):385-95.
7.Li X, Yuan Z, Wei X, Li H, Zhao G, Miao J, et al. Application potential of bone marrow mesenchymal stem cell (BMSCs) based tissue-engineering for spinal cord defect repair in rat fetuses with spina bifida aperta. Journal of materials science Materials in medicine. 2016;27(4):77.
8.Joosten EA. Biodegradable biomatrices and bridging the injured spinal cord: the corticospinal tract as a proof of principle. Cell and tissue research. 2012;349(1):375-95.
9.Perale G, Rossi F, Sundstrom E, Bacchiega S, Masi M, Forloni G, et al. Hydrogels in spinal cord injury repair strategies. ACS chemical neuroscience. 2011;2(7):336-45.
10.Matyash M, Despang F, Mandal R, Fiore D, Gelinsky M, Ikonomidou C. Novel soft alginate hydrogel strongly supports neurite growth and protects neurons against oxidative stress. Tissue engineering Part A. 2012;18(1-2):55-66.
11.Abd El-Rehim HA, El-Sawy NM, Hegazy el SA, Soliman el SA, Elbarbary AM. Improvement of antioxidant activity of chitosan by chemical treatment and ionizing radiation. Int J Biol Macromol. 2012;50(2):403-13.
12.Kelishomi ZH, Goliaei B, Mahdavi H, Nikoofar A, Rahimi M, Moosavi-Movahedi AA, et al. Antioxidant activity of low molecular weight alginate produced by thermal treatment. Food chemistry. 2016;196:897-902.
13.Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. Pharmacological reviews. 2002;54(2):271-84.
14.Facchinetti F, Dawson VL, Dawson TM. Free radicals as mediators of neuronal injury. Cellular and molecular neurobiology. 1998;18(6):667-82.
15.Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. BMC cell biology. 2006;7:14.



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06 ]

[ DOI: 10.61186/sjku.28.1.1 ]

16.Li XH, Fu YH, Lin QX, Liu ZY, Shan ZX, Deng CY, et al. Induced bone marrow mesenchymal stem cells improve cardiac performance of infarcted rat hearts. Molecular biology reports. 2012;39(2):1333-42.
17.Liu HS, Bai XW, Yang Y, Ge LH. [Multilineage potential of pulp stem cells from human young permanent teeth in vitro]. Beijing da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Peking University Health sciences. 2007;39(1):41-5.
18.Yang E, Liu N, Tang Y, Hu Y, Zhang P, Pan C, et al. Generation of neurospheres from human adipose-derived stem cells. BioMed research international. 2015;2015:743714.
19.McLenachan S, Lum MG, Waters MJ, Turnley AM. Growth hormone promotes proliferation of adult neurosphere cultures. Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society. 2009;19(3):212-8.
20.Jensen JB, Parmar M. Strengths and limitations of the neurosphere culture system. Molecular neurobiology. 2006;34(3):153-61.
21.Galli R. The Neurosphere Assay (NSA) Applied to Neural Stem Cells (NSCs) and Cancer Stem Cells (CSCs). Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2019;1953:139-49.
22.Rastogi P, Kandasubramanian B. Review of alginate-based hydrogel bioprinting for application in tissue engineering. Biofabrication. 2019;11(4):042001.
23.Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. Cold Spring Harbor protocols. 2018;2018(6).
24.Chan LL, Smith T, Kumph KA, Kuksin D, Kessel S, Déry O, et al. A high-throughput AO/PI-based cell concentration and viability detection method using the Celigo image cytometry. Cytotechnology. 2016;68(5):2015-25.
25.Hassanzadeh K, Nikzaban M, Moloudi MR, Izadpanah E. Effect of selegiline on neural stem cells differentiation: a possible role for neurotrophic factors. Iranian journal of basic medical sciences. 2015;18(6):549-54.
26.Abolfathi AA, Vahabzadeh Z, Mahmoodiaghdam N, Vahabzadeh D, Hakhamanesh MS. Effects of taurine and homocysteine on lipid profile and oxidative stress in fructose-fed rats. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences. 2017;22(3):49-59.
27.Khosrobakhsh F, Moloudi MR, Bigdelo M, Rahimi A. Effect of cholestasis on dynamin-related protein 1 (Drp1) gene expression in rat liver. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences. 2017;22(4).
28.Choe G, Kim SW, Park J, Park J, Kim S, Kim YS, et al. Anti-oxidant activity reinforced reduced graphene oxide/alginate microgels: Mesenchymal stem cell encapsulation and regeneration of infarcted hearts. Biomaterials. 2019;225:119513.
29.Kerschenmeyer A, Arlov Ø, Malheiro V, Steinwachs M, Rottmar M, Maniura-Weber K, et al. Anti-oxidant and immune-modulatory properties of sulfated alginate derivatives on human chondrocytes and macrophages. Biomaterials science. 2017;5(9):1756-65.
30.Khosravizadeh Z, Razavi S, Bahramian H, Kazemi M. The beneficial effect of encapsulated human adipose-derived stem cells in alginate hydrogel on neural differentiation. Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials. 2014;102(4):749-55.
31.Ghorbani S, Tiraihi T, Soleimani M. Differentiation of mesenchymal stem cells into neuron-like cells using composite 3D scaffold combined with valproic acid induction. Journal of biomaterials applications. 2018;32(6):702-15.

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-06 ]

[ DOI: 10.61186/sjku.28.1.1 ]