

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

Leila Salari asl¹, Taki Tiraihi²

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 the treatment 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 (H₂O₂), 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 FRAP were 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

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^۱، تقی طریقی^۲

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: ۰۲۱-۳۳۷۴۴۴۵۸

چکیده

زمینه و هدف: سلول درمانی یکی از روش های درمانی امیدوار کننده جهت درمان ضایعات نخاعی به شمار می رود. 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 بعثت نبود یک بستر مناسب برای سلول ها استفاده از این روش محدود شده است. حدوداً 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 ایمنوسیتوشیمی و واکنش زنجیره ای پلی مرز معکوس ارزیابی شدند. القای آپوپتوز توسط پراکسید هیدروژن 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 *Bcl2* 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 کپسول 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، القاء، سلول های بنیادی عصبی، والپروئیک اسید

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

مقدمه

عده زیادی از مردم جهان به آسیب‌های 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 روش‌های درمانی مناسب جهت بازگرداندن سلول‌هایی است که در طی آسیب‌های عصبی مرکزی از دست رفته‌اند (۱). سلول‌های بنیادی عصبی انتخاب مناسبی برای این روش درمانی به حساب می‌آیند، یکی از منابع مهم تهیه سلول‌های بنیادی عصبی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان می‌باشند. در این مطالعه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به عنوان منبع سلولی استفاده شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بعنوان بهترین سلول‌های بنیادی در جهت سلول درمانی شناخته شده‌اند. به دلیل آنکه این سلول‌ها 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، ژن‌های اکتودرمال، مزودرمال و اندودرمال را بیان می‌کنند، واکنش ایمنی در میزبان ایجاد نمی‌کند و کاربرد آن‌ها هیچ گونه موانع اخلاقی قانونی ندارد (۳)، قدرت خودتکثیری و تمایز بالایی را در *in vitro* دارند، به طوری که قادرند در شرایط *in vitro, in vivo* به سلول‌های عصبی تمایز یابند (۴). با استفاده از مواد القا کننده می‌توان مسیر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (BMSC) را به سمت رده خاصی از سلول‌های عصبی هدایت نمود و درصد بالایی از سلول‌های عصبی را به دست آورد.

اما با وجود مزایای فراوان استفاده از روش سلول درمانی در درمان آسیب‌های نخاعی، کاربرد این روش به علت آنکه تنها عده کمی از سلول‌های انتقال یافته پس از انتقال به سیستم عصبی مرکزی زنده می‌مانند، بسیار محدود شده است (۵، ۶). بنابراین استفاده از روش‌هایی که میزان حیات و تقسیم سلول‌های بنیادی عصبی را پس از انتقال به بدن

بیمار افزایش دهد، ضروری به نظر می‌رسد. یکی از روش‌های مناسب جهت دستیابی به این هدف، استفاده از ناقل‌های سلولی است (۷).

یکی از مناسب‌ترین این ناقل‌ها، هیدروژل‌ها هستند و برای ساختن آن‌ها از مواد و ترکیبات مختلفی می‌توان استفاده کرد به طور مثال آلژینات از قبیل مواد مفید و مورد استفاده در ساخت هیدروژل‌ها می‌باشد. آلژینات یک پلی ساکارید خطی غیرمنشعب است و از یک جلبک قهوه‌ای به دست می‌آید و از واحد‌های تکرار شونده الفال-گلوکرونیک اسید و بتا-دی منورونیک اسید ساخته شده است (۸). و به منظور تشکیل هیدروژل از کاتیون‌های چندظرفیتی مانند کلسیم استفاده می‌شود، زیرا این پلی ساکارید خود دارای واحد‌های گلوکرونیک اسید با بار منفی است که با کمک کاتیون‌ها پیوند یونی برقرار می‌کند (۹) و این زنجیره‌های پلی ساکاریدی این امکان را دارند که با هم تشکیل شبکه‌هایی را بدهند و به صورت هیدروژل جهت انکپسوله کردن سلول‌ها به دست آیند Marina Matyash و همکاران در سال ۲۰۱۲ خاصیت حفاظتی آلژینات برای سلول‌های تیمار شده با رادیکال‌های آزاد را مورد بررسی قرار دادند.

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

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 می شود. 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 آلزینات بر سلول ها در مقابل رادیکال های آزاد انجام شد.

روش ها

جداسازی و کشت سلول های 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 استخوان های 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، اپی فیزهای استخوان ها جدا شد و توسط سرنگ با ۲۲ Gage (Dulbecco Modified DMEM (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 CO₂ 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 سلول ها کف فلاسک را پر کردند، با استفاده از تریپسین / Ethylene EDTA (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 فلوسیتومتری، نمونه که در حقیقت یک سوسپانسیون سلولی در بافر فسفات به همراه ۲ درصد FBS است به درون مایعی دیگر که معمولاً بافر یا آب است با نام مایع غلافی تزریق شد. در حین آماده سازی نمونه برای انواع آزمایشات فلوسیتومتری، 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. زمانی که سلول از مقابل پرتوی لیزر عبور کرد یک پالس با ارتفاع، پهنا و سطح زیر نمودار مشخصی ایجاد شد. مارکرهای CD31, CD45 بعنوان مارکرهای منفی و CD44, CD73, CD90 بعنوان مارکرهای مثبت برای سلول های مزانشیمی مغز استخوان توسط روش فلوسیتومتری مورد ارزیابی قرار گرفته شدند (۱۶، ۱۷).

تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به نورو سفر: 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 نورو سفر تبدیل شدند. برای این منظور سلول ها در پاساژ چهارم تریپسین شدند و بعد از تعیین درصد سلول های زنده توسط رنگ حیاتی تریپان بلو ۰/۴ درصد به پلیت های شش خانه نجسب منتقل شدند (۵۰۰ هزار سلول در هر خانه) و توسط محیط DMEM/F12 با ترکیبی از 2% B27، EGF و bFGF به

برای جلوگیری از خشک شدن آنتی بادی، نمونه‌ها در محفظه مرطوب قرار داده شدند. در ادامه بعد از ۱۲ ساعت آنتی بادی اولیه با PBS شستشو 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 سلول‌ها از DAPI یا PI با غلظت ۱ میلی گرم در ۱۰۰۰ میکرولیتر به مدت ۱ دقیقه استفاده شد. جهت بررسی سلول‌های مثبت، نمونه‌ها با توسط میکروسکوپ فلورسانس اینورت با بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند (۱۸).

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

تایید ماهیت سلول‌های بنیادی عصبی با ایمونوسیتوشیمی: سلول‌های 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 سلول‌ها بعد از ترپسینه شدن و جدا شدن از کف فلاسک به پلیت‌های پوشیده شده با لامل‌های ژلاتینه منتقل شدند و بعد از پر شدن کف پلیت این سلول‌ها برای انجام ایمونوسیتوشیمی انتخاب شدند. ابتدا محیط سلول‌ها دور ریخته شد و با فسفات بافر سالین (PBS) سه مرتبه به مدت ۵ دقیقه شستشو شدند. سپس توسط پارافرآلدئید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه فیکس شدند. سپس غشاء سلول‌ها توسط تریتون ۰/۳ درصد برای مدت ۳۰ دقیقه در یک ظرف مرطوب نفوذپذیر و در مرحله بعدی برای جلوگیری از واکنش‌های غیر اختصاصی سطح رویی سلول‌ها با سرم بز ۱۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه پوشش داده شد، در نهایت، به منظور ایجاد نفوذپذیری غشاء از تریتون (Triton x-100) استفاده شد. سپس به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه

میزان ۲۰ نانوگرم در میلی لیتر کشت داده شدند. برای این منظور پلاک سلولی به دست آمده بعد از سانتریفوژ سلول‌های ترپسینه شده با ۲۰۰ میکرولیتر از محیط نوروسفر کاملاً پیتاژ 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 نمونه‌ها اضافه شد. بعد از ۶ الی ۷ روز و تجمع سلول‌ها کنار هم به منظور بررسی و تایید نوروسفرها از لحاظ ایمونوسیتوشیمی به لامل‌های ژلاتینه انتقال داده شد (۱۸-۲۰).

تایید ماهیت نوروسفر با ایمونوسیتوشیمی:

برای بررسی مارکرهای اختصاصی نوروسفر مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۶ الی ۷ روز بعد از تشکیل اسفرها، آنها به پلیت‌هایی 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 سلول‌ها توسط پارافرآلدئید ۴ درصد برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه فیکس شدند. به منظور رنگ آمیزی عناصر سیتوپلاسمی غشاء سلول‌ها توسط تریتون ۰/۳ درصد برای مدت ۳۰ دقیقه نفوذپذیر شدند. سپس با اضافه کردن سرم بز ۱۰ درصد برای مدت ۲۰ دقیقه از واکنش‌های غیر اختصاصی جلوگیری شد. سپس برای مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه در معرض آنتی بادی‌های 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)

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 آلزینات:

ابتدا شمارش سلولی انجام شد و سپس $10^6/\text{ml}$ سلول با محلول آلزینات تهیه شده ترکیب شد و سوسپانسیون سلول و آلزینات حاصل شد. در نهایت برای قطره گذاری و ساخت هیدروژل از سرنگ با Gage 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 کلراید 50mM و سدیم کلراید 140mM انجام شد قطره های هیدروژل محتوی سلول ها 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 و شو 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 آلزینات 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 (Dimethyl 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 الیزایدر 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 آلزینات 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 اورنج و پروپیدیوم یداید (Acridin Orang/Propidium Iodide) استفاده شد. ابتدا محیط رویی سلول ها تخلیه و با PBS شست و شو داده شد. و سپس ۲۰ میکرولیتر محلول رنگ آکریدین اورنج (0.1 mg/ml) / پروپیدیوم یداید (0.001 mg/ml) بر روی سلول ها ریخته شد و سریعاً توسط میکروسکوپ فلورسنت مشاهده گردید. سلول های زنده به علت حضور رنگ آکریدین اورنج به رنگ سبز و سلول های مرده به علت 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 می شوند و سپس در همان شرایط کشت، وزن آن ها اندازه گیری می شود. ابتدا وزن اولیه هیدروژل ها اندازه گیری 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 اندازه گیری شد، نمودار آن رسم شد، بدین منظور این روش استفاده می شود که میزان تخلخل هیدروژل برای

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 پیست شد و سپس با استفاده از دستگاه سونیکت (با فرکانس ۵۰ Hz، دامنه ۸۰، نیم سیکل در ثانیه) سلول‌ها شکسته شدند و با دور ۱۲۰۰۰ RPM به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ شد از سوپ رویی که حاوی شیر سلول‌ها بود، برای انجام تست‌ها استفاده گردید؛ تمام این مراحل برای ۴ گروه مورد مطالعه انجام شد؛ (سلول‌های 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.

سلول‌های کشت شده در شرایط دو بعدی با EDTA/تریپسین از کف پلیت جدا شدند و سلول‌های کشت شده در شرایط سه بعدی نیز با هیدروژل‌ها برداشته شدند و هر دو گروه به ۱ میلی لیتر محلول DCFH-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 گروه‌های مختلف با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمد.

غلظت‌های 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 سلول‌ها اضافه شد. میزان شدت فلورسنتی با استفاده از اسپکتروفلورومتر اندازگیری شد و منحنی استاندارد رسم شد.

تمایز سلول‌های بنیادی عصبی به سلول‌های شبه نورونی: به منظور تمایز سلول‌های بنیادی عصبی به سمت سلول‌های شش‌به‌نورنی، از سلول‌های پاساژ ۳ استفاده گردید. تعداد 10^6 سلول شمارش شد و بعد از تهیه سوسپانسیون سلولی در محلول آلژینات و کپسولدار کردن سلول‌ها از محیط تمایزی جهت تمایز این سلول‌ها استفاده شد. برای تمایز سلول‌ها از محیط DMEM/10% FBS همراه یک میلی مولار والپروئیک اسید (VA) استفاده شد. همچنین گروه کنترل در شرایط دو بعدی تحت تاثیر محیط تمایزی در پلیت‌های ۱۲ خانه ای کشت داده شدند و از نظر میزان تمایز با گروه سه بعدی مقایسه شدند (۲۵).

تایید ماهیت سلول‌های شبه نورونی:

برای تایید ماهیت سلول‌های شبه نورونی از روش PCR جهت بررسی بیان ژن‌های مارکرهای عصبی استفاده شد. در این روش میزان بیان NF200, Neurogenin, Nestin و Neuro D با 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 سلول‌های 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 غلظت‌های ۱، ۵/۰، ۲۵/۰، ۱۲۵/۰ و ۰ میلی مولار) به آن افزوده شد و کاملاً ورتکس گردید. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد جذب نور کلیه نمونه‌ها در طول موج 593nm خوانده شد و میزان FRAP در نمونه‌های مجهول براساس نمودار استاندارد محاسبه شد.

جهت بدست آوردن میزان FRAP در نمونه مجهول سلول‌های مورد مطالعه ابتدا از کف ظرف کشت جدا شدند و با

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 $P \leq 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج حاصل از سه تکرار بوده و به صورت میانگین \pm 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:

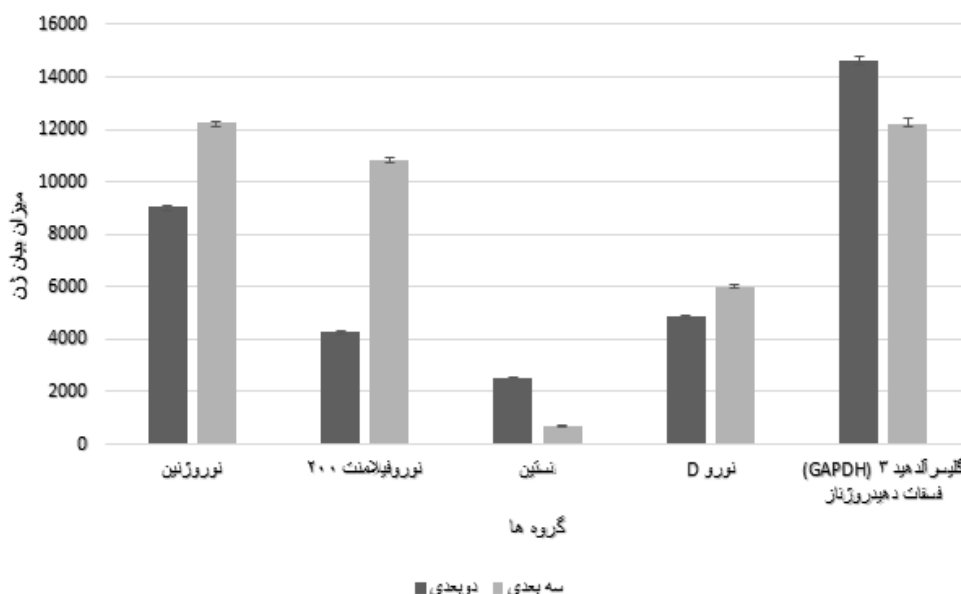
نمونه مغز استخوانی که تازه از دیافیز استخوان های فمور و تیبا به داخل فلاسک تخلیه شده شامل مجموعه ای از سلول های بنیادی مزانشیمی و خون ساز است. ولی به دنبال پاساژهای مکرر، از تعداد سلول های رده خونی کاسته و به سلول های استرومایی افزوده شده است، زیرا که این سلول ها به کف فلاسک می چسبیدند. آنها را می توان 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 فیروبلستی می باشند. و در پاساژهای بالاتر سلول ها کاملاً 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

بررسی آپوپتوز با روش RT-PCR:

به منظور بررسی آپوپتوز در گروه های مورد مطالعه ژن های BAX, bcl₂, 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, RNA 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 گراد انکوبه شد و سپس در فریزر -۸۰ نگهداری شد سپس به منظور از بین بردن آلودگی احتمالی RNA با DNA از آنزیم DNase عاری 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).

میکرومتر می‌رسند. همچنین در این مطالعه نشان داده شده است که بعد از انتقال نوروسفرها به فلاسک‌های بچسب به کف فلاسک چسبیده و به شکل سلول‌های کشیده و دوقطبی دیده می‌شوند، سلول‌های بنیادی عصبی نامیده می‌شوند (مطابق شکل ۱).



شکل ۱. بررسی میزان بیان ژن‌های شبه نورونی با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلی مرایی در گروه‌های مورد مطالعه پس از تمایز در محیط دو بعدی و سه بعدی، بیان ژن‌های نوروزن و نوروفیلامنت ۲۰۰ در گروه سه بعدی به طور قابل ملاحظه ای از گروه دوبعدی بیشتر است و میزان بیان ژن نستین در گروه دو بعدی بالاتر است ژن خانه دار گلیسرآلدئید ۳ فسفات دهیدروژناز (GAPDH) در دو گروه بررسی شده است.

و برای تایید ماهیت نوروسفرها و سلول‌های بنیادی عصبی نیز از روش ایمونوسیتوشیمی (مطابق شکل ۴) استفاده شد بررسی ایمونوسیتوشیمی نوروسفرها بعد از ۷ نشان داد که این ساختارها مارکرهای عصبی نستین و نوروفیلامنت های ۶۸ و همچنین مارکرهای سلول‌های بنیادی نظیر SOX₂ و OCT₄ را بیان می‌کنند و همچنین بررسی سلول های بنیادی عصبی نیز بیان مارکرهای نستین، نوروفیلامنت های ۶۸، OCT₄ و SOX₂ را (مطابق شکل ۵) نشان می‌دهند. هسته سلول‌ها با PI و DAPI رنگ آمیزی شد. تایید تمایز سلول‌های بنیادی عصبی به سلول‌های شبه نورونی در طی یک هفته با ۱ میلی مولار والپروئیک اسید، با بررسی بیان یا عدم بیان ژن‌های Nestin، NF200، Neuro d،

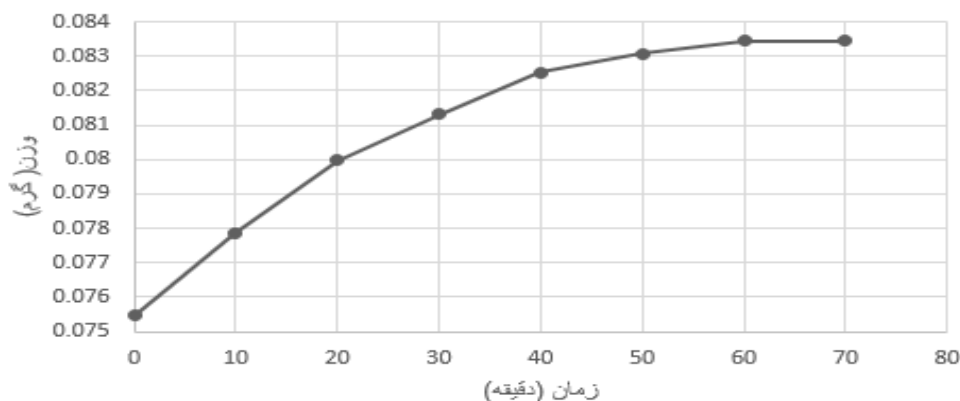
شناور و کرووی شکل با هسته نامشخص ایجاد می‌کنند که به این اسفرها، نوروسفر گفته می‌شود. قطر اسفرها در روز اول حدوداً ۱۰۰ میکرومتر بوده که از تعداد کمی سلول تشکیل شده است و از روز اول تا سوم تعداد اسفرها افزایش می‌یابد و سپس از روز سوم تا هفتم از تعداد آنها کاسته و به قطرشان افزوده می‌شود که حدوداً در روز هفتم به قطر ۲۰۰

تایید ماهیت سلول‌ها: به منظور بررسی ماهیت استرومایی سلول‌های چسبیده به کف فلاسک و تایید منشأ مزانشیمی آنها از روش فلوسیتومتری استفاده شد (مطابق شکل ۲)، به این منظور سلول‌ها در پاساژ چهارم مورد بررسی قرار گرفتند؛ مارکر سطحی سلول‌های هماتوپوئیتیک (CD45 (3.13%) و مارکر سطحی سلول‌های اندوتلیال (CD31 (2.96%) منفی شدند اما مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی (CD90 (77.17%)، CD73 (98.37%)، CD44 (75.74%) و CD90 (77.17%) مثبت شدند. جهت تایید صحت انجام روش فلوسایتمتری، گروه کنترل با آنتی بادی‌های ایزوتایپ کونژوگه با FITC و PE انجام شد، (مطابق شکل ۳).

Neurogenin با روش RT-PCR (مطابق شکل ۶ و نمودار ۱) 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 نمودار شماره 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 یوید (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 ($0.23/0.23$) بود و گروه دو بعدی تیمار شده با H_2O_2 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 تیمار شده با H_2O_2 بود.

بررسی آپوپتوز با روش RT-PCR:

به منظور بررسی آپوپتوز در گروه های مورد مطالعه ژن های BAX, bcl₂, Survivin مورد مطالعه قرار گرفتند و مطابق شکل ۸ در گروه های سه بعدی و دو بعدی بدون

مجاورت با H_2O_2 ژن‌های *bcl2*, *Survivin* بیان شدند و BAX بیان نشد، همچنین در گروه دوبعدی با H_2O_2 ژن BAX بیان شد و ژن‌های *bcl2*, *Survivin* بیان نشدند. H_2O_2 فقط ژن *bcl2* بیان شده و ژن‌های *Survivin* ,

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در RT-PCR برای تایید ماهیت سلول‌های شبه نوروبی

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

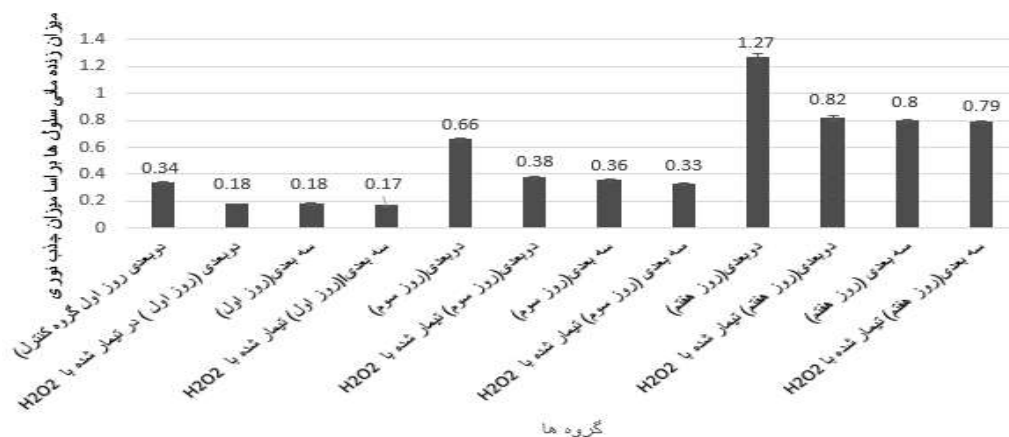
جدول ۲. پرایمرهای مورد استفاده در RT-PCR به منظور بررسی آپوپتوز

نام	توالی	اندازه	دما
Bcl2	FORWARD: TGGGATGCCTTTGTGGAA REVERSE: TCTGCTGACCTCACTTGT	148	56.29 55.3
SURVIVIN	FORWARD: TTACAGGAGACCGTGACA REVERSE: AAAGCCACAAAACCAAAGAG	104	54.68 54.88
BAX	FORWARD: GTCCTCACTGCCTCACTCAC REVERSE: CTTCCCCGTTCCCCATTCA	121	60.04 59.96
GADH	FORWARD: CATACTCAGCACCAGCATCACC REVERSE: AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG	121	61.3 61.5

جدول ۳. بررسی میانگین غلظت آن‌تی اکسیدان‌ها و میزان ROS درون سلولی و رابطه میان آن دو در گروه‌های مورد مطالعه

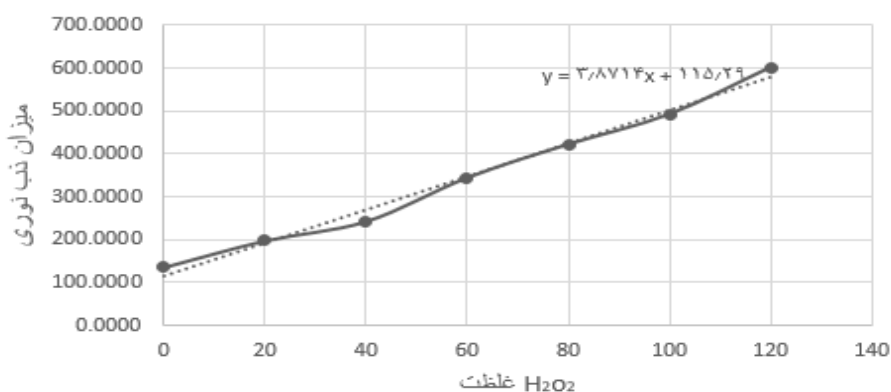
گروه‌ها	میانگین غلظت آن‌تی اکسیدان‌های محلول	میانگین غلظت ROS درون سلولی	رابطه میان میزان آن‌تی اکسیدان‌ها و ROS
دوبعدی	281 ± 38^a	20.07112 ± 0.03^a	-0.977
دوبعدی پس از تیمار با H_2O_2	108 ± 17^b	$23.230183333333 \pm 0.06^b$	-0.956
سه بعدی	474 ± 63^c	0.07	-1
سه بعدی پس از تیمار با H_2O_2	209 ± 27^a	$15.859893333333 \pm 0.02^d$	-0.881

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

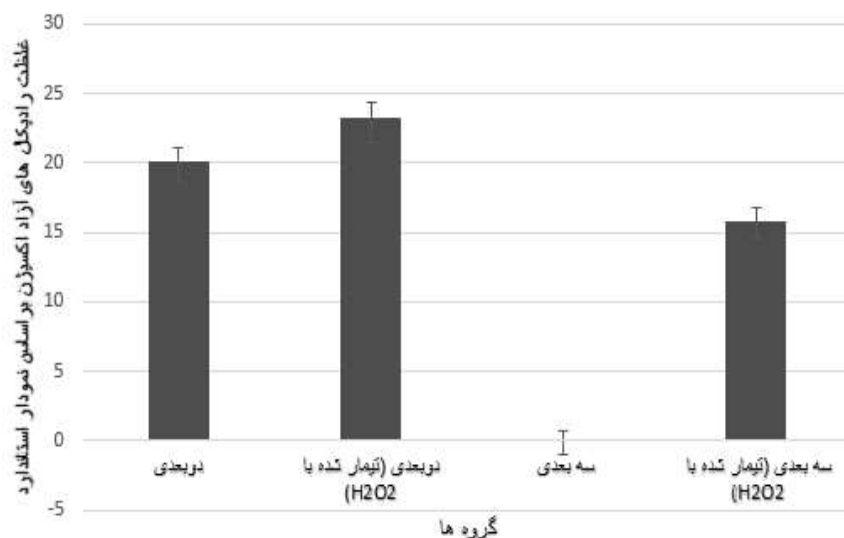


شکل ۳. بررسی کمی بقای سلول های کپسوله شده در هیدروژل آلژینات پس از مجاورت با پراکسید هیدروژن و بدون حضور پراکسید هیدروژن و مقایسه با گروه کنترل با روش MTT. در اینجا بیش ترین بقا سلول ها مربوط به کشت دوبعدی بدون تیمار با H_2O_2 و کمترین مربوط به دوبعدی تیمار شده با H_2O_2

(الف)

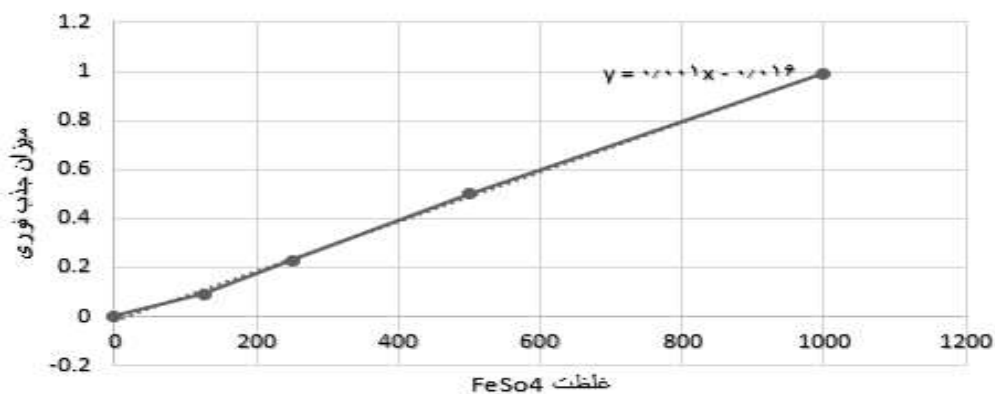


(ب)

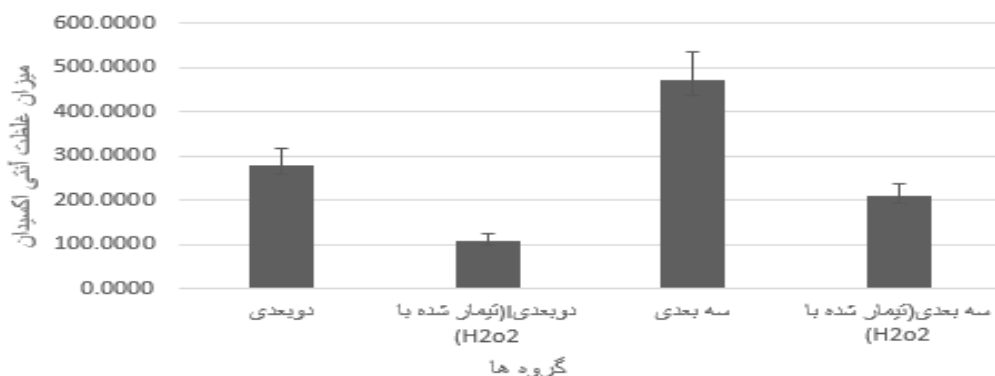


شکل ۴. اندازه‌گیری میزان ROS در گروه‌های مورد مطالعه، الف) نمودار استاندارد بر اساس غلظت‌های مختلف H₂O₂، ب) نمودار Extrapolated میزان ROS درون سلولی در گروه‌های مورد مطالعه که پس از گرفتن جذب نوری با استفاده از نمودار استاندارد میزان آن محاسبه شد

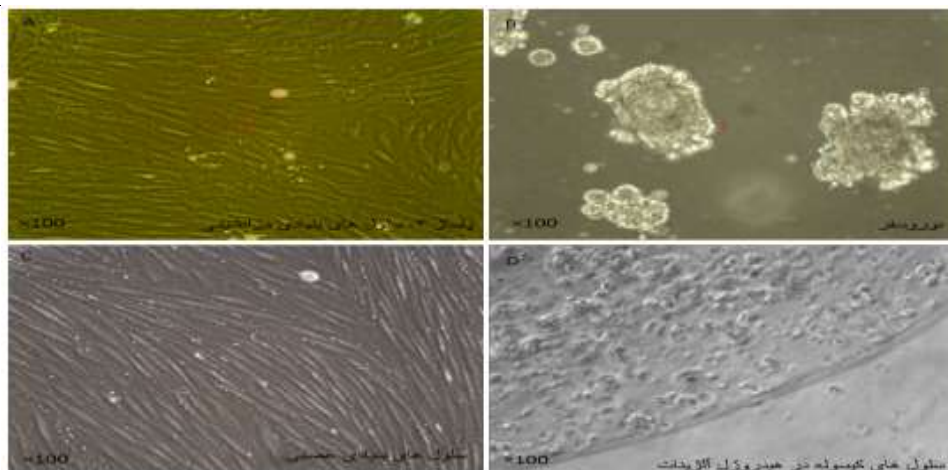
(الف)



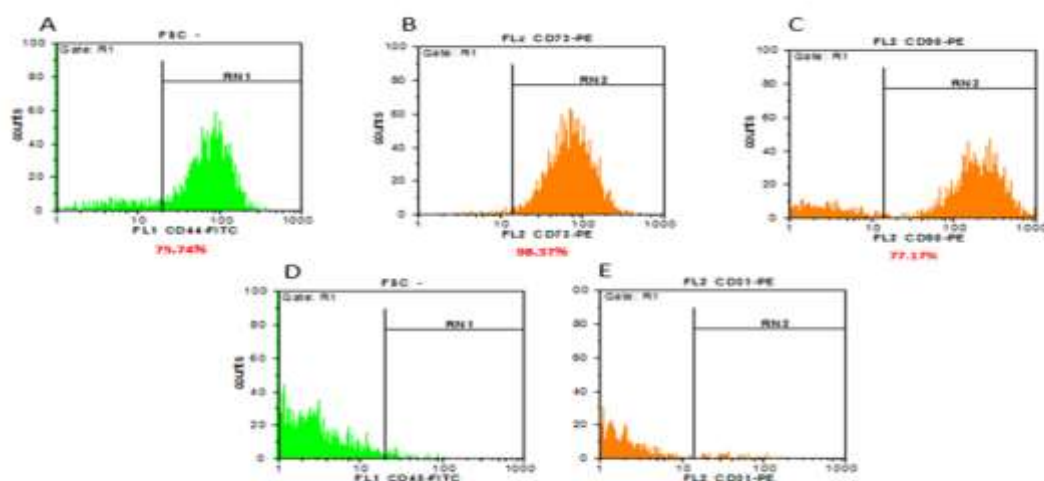
(ب)



شکل ۵. تست FRAP جهت اندازه‌گیری میزان آنتی اکسیدان کل. الف) نمودار استاندارد، ب) نمودار غلظت‌های آنتی اکسیدان کل در گروه‌های مورد مطالعه. میزان آنتی اکسیدان کل در هر ۴ گروه اندازه‌گیری شد و از طریق نمودار استاندارد میزان آن محاسبه شد که گروه سه بعدی بخاطر خاصیت آنتی اکسیدانی هیدروژل بیشترین میزان را دارد.



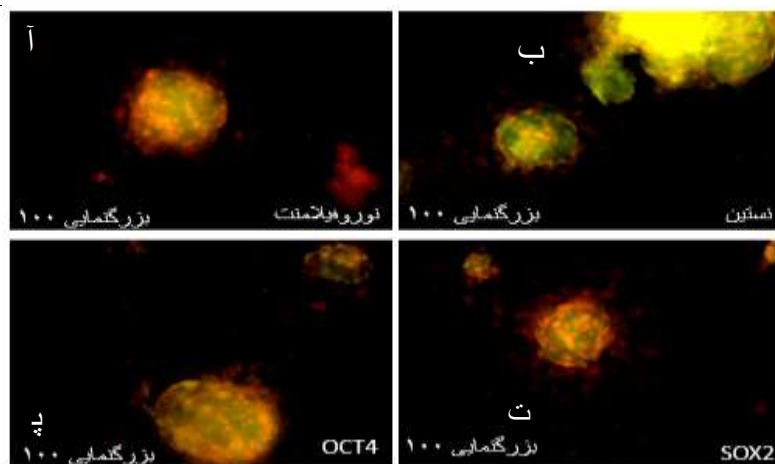
شکل ۶. بررسی مورفولوژی سلول های مورد مطالعه. (A) سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان کشت شده در محیط کشت (B) نوروسفرهای تشکیل شده در محیط تمایز از سلول های بنیادی مزانشیمی پس از ۷ روز کشت، (C) سلول های بنیادی عصبی تشکیل شده از نوروسفرها در محیط تمایزی، (D) سلول های انکپسوله شده در هیدروژل آلژینات



شکل ۷. تایید ماهیت سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در پاساژ چهارم با روش فلوسیتومتری (A) بیان مارکر سلول های بنیادی مزانشیمی CD44(%75.74) کوئزوگه با FITC. B. بیان مارکر سلول های بنیادی مزانشیمی CD73(%98.37) کوئزوگه با PE. C. بیان مارکر سلول های بنیادی مزانشیمی CD90(%77.17) کوئزوگه با PE. D. عدم بیان مارکر هماتوپوئیتیک، (E) عدم بیان مارکر اندوتلیالی

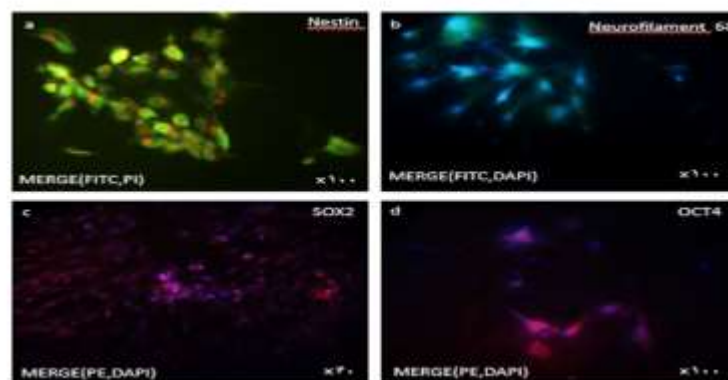


شکل ۸. کنترل FITC و PE. با روش فلوسیتومتری (A) کنترل با آنتی بادی های کوئزوگه با FITC و (B) کنترل با آنتی بادی های کوئزوگه با PE



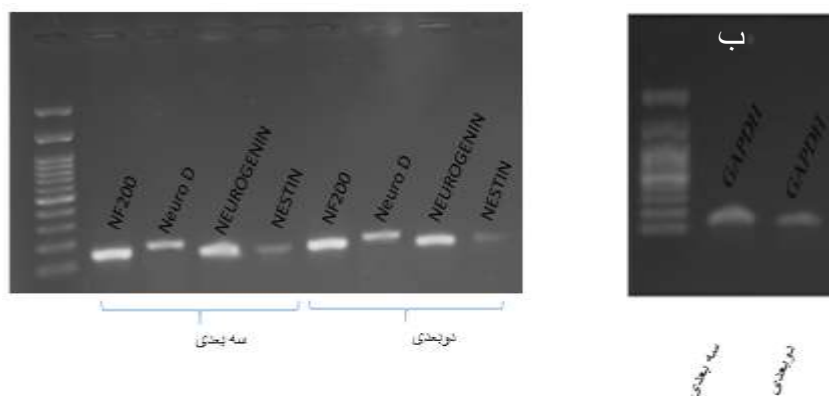
شکل ۹. تایید ماهیت نوروسفرها با روش ایمونوسیتوشیمی

آ) آنتی بادی نوروفیلانمنت کونزوگه با FITC و رنگ آمیزی هسته با Pi (ب) آنتی بادی نستین کونزوگه با FITC و رنگ آمیزی هسته با Pi (پ) آنتی بادی OCT4 کونزوگه با FITC و رنگ آمیزی هسته با Pi (ت) آنتی بادی SOX2 کونزوگه با FITC و رنگ آمیزی هسته با Pi



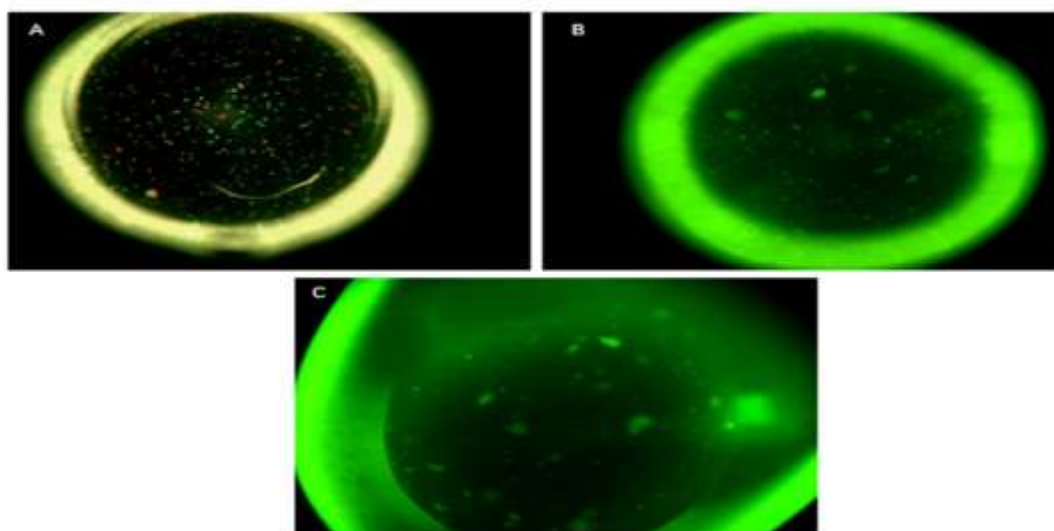
شکل ۱۰. تایید ماهیت سلول های بنیادی عصبی با روش ایمونوسیتوشیمی

A) آنتی بادی نستین کونزوگه با FITC و رنگ آمیزی هسته با Pi (B) آنتی بادی نوروفیلانمنت ۶۸ کونزوگه با FITC و رنگ آمیزی هسته با Pi (C) آنتی بادی SOX2 کونزوگه با FITC و رنگ آمیزی هسته با Pi (D) آنتی بادی OCT4 کونزوگه با FITC و رنگ آمیزی هسته با Pi



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

آ) مقایسه بیان مارکرهای نوروفیلانمنت، Neuro D، Neurogenin و نستین در شرایط دوعده ای و سه بعدی (ب) بیان ژن های خانه دار GAPDH



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



شکل ۸. بررسی بیان ژن های آپوپتوزی در گروه های مورد مطالعه با روش RT-PCR.

بحث

نتایج حاصل از اندازه 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 می باشند. بررسی این نتایج گویای این مطلب

است که آلژینات با دارا بودن خاصیت آنتی اکسیدانی و همچنین خاصیت حفاظتی باعث کاهش میزان ROS القا شده توسط H_2O_2 می شود. همچنین نتایج حاصل از بررسی میزان آنتی اکسیدان های موجود در گروه های مختلف نشان داد؛ پایین ترین میزان غلظت آنتی اکسیدانی کل در سلول های کشت شده دوبعدی پس از تیمار با H_2O_2 و بالاترین میزان

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 بقا 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 می باشد همچنین میزان بقا 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 MAP2, 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 NF200 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 می توان 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.

آنتی اکسیدان ها در گروه کشت سه بعدی بدون حضور H_2O_2 می باشند 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 می باشد. همچنین مطالعه و بررسی میزان بقا 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 سولفات 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 بقا 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 می باشد. اما بعلاوه آماده سازی اولیه سلول ها و کپسول دار کردن آنها تعدادی از سلول ها دچار مرگ سلولی شدند که کاهش بقا را در

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

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.

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

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.

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.