مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
سال ۱۳۹۸، دوره ۲۱، صفحه ۲۷۲-۲۶۶

تمایز عصبی سلولهای بنیادی ژله‌وارتون در محیط کشت سه بعدی پایه کیتوزان

الهه منصوری (MSc)[۱]، شبنم کرمانی (PhD)[۱]، اکرم علیزاده (PhD)[۲*]

۱-گروه مهندسی مواد، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، ایران
۲-گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

دریافت: ۹۷/۱۰/۱۱، اصلاح: ۹۸/۱/۲۷، پذیرش: ۹۸/۲/۲۲

خلاصه

سابقه وهدف: سلولهای بنیادی ژله وارتون می‌توانند گزینه مناسبی برای تمایز و ترمیم آسیب‌های بافت عصبی باشند. کشت سه بعدی با فراهم آوردن محیطی شبیه بدن نسبت به کشت دو بعدی مزیت دارد. هدف از این مطالعه تمایز عصبی این سلولها در محیط کشت سه بعدی پایه کیتوزان است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در ۴ گروه (کشت دو بعدی در حضور محیط تمایزعصبی و عدم حضور آن و کشت سه بعدی در حضور محیط تمایز عصبی و عدم حضورآن) بر روی سلولهای بنیادی ژله وارتون انسانی انجام شد. برای ساخت هیدروژل، هیدروکسی‌اتیل‌سلولز با نسبت ۴/۸: ۰/۸(HEC: CH- β-GF) به محلول کیتوزان-بتاگلیسروفسفات اضافه شد. سلولهای بنیادی ژله‌وارتون پس از استخراج به روش آنزیمی از ژله وارتون نوزادان بیمارستان امام خمینی تهران و تایید به روش فلوسیتومتری به تعداد ۵×۱۰^{۵} سلول در هر چاهک پلیت۲۴ خانه تحت تاثیر محیط کشت تمایزی در شرایط دو بعدی و سه بعدی به مدت ۴ روز کشت داده شدند. سپس بررسی کمی بیان ژنهای β-Tubulin III وNestin به عنوان دو مارکر و معیار سنجش تمایز عصبی و ژن β-actin (به عنوان کنترل داخلی و ژن معیار یا رفرنس) توسط Real time PCR انجام شد.

یافته‌ها: نتایج Real time PCR نشان داد، بیان ژنهای β-Tubulin III وNestin در سلولهای بنیادی ژله وارتون در حضور محیط تمایز عصبی در هر دو شرایط کشت سه بعدی (بیش از ۲ برابر) و دو بعدی (بیش از ۴ برابر) نسبت به عدم حضور آن افزایش معنی‌دار دارد ($p<۰/۰۰۵$). اما بیان این ژنها تحت تاثیر محیط تمایز عصبی در شرایط کشت سه بعدی نسبت به شرایط کشت دو بعدی به طور معنی‌داری (بیش از ۱/۵ برابر) بیشتر بود ($p<۰/۰۱$).

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده نشان داد تمایز عصبی در سلولهای بنیادی ژله‌وارتون در محیط کشت سه بعدی پایه کیتوزان بیشتر است.

واژه های کلیدی: ژله‌وارتون، سلول بنیادی، تمایز عصبی، کیتوزان.

مقدمه

استفاده از درمانهای مبتنی بر سلول و سلولهای بنیادی در زمینه درمان بیماریها و آسیبهای دستگاه عصبی بسیار امید بخش بوده است (۲و۱). از منابع مهم سلولهای بنیادی میتوان به سلولهای بنیادی ژله‌وارتون اشاره کرد. ویژگی‌هایی از جمله در دسترس بودن، قابلیت تکثیر فراوان بدون خطر ایجاد تومور، پتانسیل تمایزی بالای آنها برای تبدیل به انواع بافتها، امکان پیوند اتولوگ برای خود فرد و یا آلوژنیک برای فرد دیگر دلیل مطالعه وسیع این سلول ها در مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی بوده است (۳). علاوه بر این، سلولهای بنیادی استخراج شده از ژله‌وارتون نسبت به مغز استخوان و بافت چربی پتانسیل تمایزی بالاتری برای تبدیل به پیش سازهای عصبی دارند (۴) و با ترشح عوامل نوروتروفیک و سیتوکاینها باعث بقا، حمایت و ترمیم سلولهای عصبی می شوند (۵). در مطالعه‌ای پیوندین سلولها پس از تمایز به سلولهای عصبی در مدل ایسکمی مغزی باعث بهبودی چشمگیری شد (۶).یکی از مهمترین نکات در استفاده از این سلولها کشت و تمایز آنها در آزمایشگاه است. در این راستا استفاده از کشت سه بعدی با تقلید از محیط سه بعدی و طبیعی بدن مزایای فراوانی دارد (۷). استفاده از کشت سه بعدی در مطالعات مختلف مربوط به بررسی سلولهای عصبی و یا تمایز عصبی نتایج متفاوتی نسبت به کشت دو بعدی داشته است. در چند مطالعه استفاده از کشت سه بعدی در مدلسازی ابتلای سیستم عصبی به عفونت ویروسی و یا غربالگری تمایز سلولی موثرتر گزارش شده است (۹و۸). هیدروژلهای پایه کیتوزان از داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت هستند که می توانند شرایط ماتریکس خارج سلولی طبیعی را تقلید و محیط سه بعدی برای رشد سلول فراهم کنند (۱۰). استفاده از سلولهای بنیادی ژله‌وارتون به همراه هیدروژلی که بتواند محیط سه بعدی مورد نیاز رشد آنها را فراهم کند، می تواند راهکاری مناسب برای درمان آسیب به بافت عصبی باشد (۱۲و۱۱). کیتوزان (Chitosan: CH) یک پلی ساکارید طبیعی است که از کیتین به دست می‌آید. کیتوزان زیست سازگار و زیست تخریب پذیر، دارای خاصیت ضد رادیکال آزاد و حفاظت کنندگی عصبی می‌باشد. همچنین باعث تسهیل چسبندگی و رشد سلول عصبی می‌شود و دارای نرخ تخریب قابل تنظیم (۱۳) و خاصیت آنتی باکتریالی (۱۴) است. بنابرین می‌تواند داربست مناسبی جهت کشت سه بعدی و تمایز عصبی سلول های بنیادی باشد.برای ساخت هیدروژل وابسته به دمای CH می‌توان از اتصال آن

▣ این مقاله حاصل پایان نامه الهه منصوری دانشجو رشته مهندسی بافت دانشگاه آزاد اسلامی واحد نجف آباد می باشد.
* مسئول مقاله: دکتر اکرم علیزاده
آدرس: سمنان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی. تلفن:۰۲۳-۳۳۴۴۱۰۲۲
E-mail:alizadeh.a@semums.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.41.6]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.266]

با بتاگلیسروفسفات (β-GP) و مشتقات سلولز نظیر هیدروکسی‌اتیل‌سلولز (HEC) استفاده کرد(۱۵). β-GP باعث می‌شود اسیدیته CH به محدوده فیزیولوژیکی نزدیک شود و از ژل شدن سریع آن جلوگیری می‌کند (۱۶). استفاده از HEC باعث بهتر شدن خواص مکانیکی و شروع بهتر فرایند ژل شدن هیدروژل می شود(۱۸و۱۷).برای بررسی تمایز عصبی سلولهای بنیادی از مارکرهای مختلفی استفاده میشود. پروتئین β-Tubulin III که به طور ویژه در نورونها وجود دارد و در ابتدای تمایز عصبی قابل بررسی است، یکی از این مارکرهاست. دیگر مارکر بیان کننده شروع تمایز عصبی Nestin است (۱۹). با توجه به مطالب بیان شده و اهمیت بررسی تمایز این سلولها در محیطهای کشت سه بعدی و از آنجائیکه تاکنون مطالعه ای در این باره انجام و گزارش نشده، این مطالعه با هدف بررسی و مقایسه تمایز عصبی سلولهای بنیادی ژله‌وارتون در هیدروژل CH-β-GP-HEC به عنوان یک محیط کشت سه بعدی نسبت به کشت دو بعدی است انجام شد.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه و گروهها: این مطالعه تجربی در ۴ گروه کشت دوبعدی سلولهای بنیادی ژله‌وارتون در حضور محیط تمایزعصبی و عدم حضور آن (محیط کشت فاقد مواد تمایز دهنده) و کشت سه بعدی سلولهای بنیادی ژله‌وارتون در حضور محیط تمایز عصبی و عدم حضور آن (محیط کشت فاقد مواد تمایز دهنده) انجام شد. به منظور بررسی و مقایسه تمایز عصبی، دو متغیر بیان ژنهای β-Tubulin III وNestin به عنوان دو مارکر و معیار سنجش تمایز عصبی و ژن β-actin (به عنوان کنترل داخلی و ژن معیار یا رفرنس) توسط Real time PCR بررسی شد. سلولهای بنیادی ژله‌وارتون از بندناف نوزادان متولد شده در بیمارستان امام خمینی پس از اخذ رضایت نامه و با تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران (کد: TUMS.rec.۲۴۰۶)جداسازی شد.

جداسازی سلولهای بنیادی ژله‌وارتون: نمونه‌های بند ناف تحت شرایط استریل درظرف حاوی نرمال سالین گذاشته شده و به آزمایشگاه منتقل شد. برای ازبین بردن آلودگیها، بندناف باالکل۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه شستشوداده شد. سپس با PBS حاوی پنی‌سیلین، استرپتومایسین، آمفی تریسین و نیز جنتامایسین شسته شد. ژله‌وارتون به کمک تیغ بیستوری استریل از بندناف جداسازی و به قطعات کمتر از ۵ میلی متر مربع تقسیم شد. قطعات به محیط کشت کامل (حاوی گلوکزبالا، ۲۰درصد FBS و ۱ درصد آنتی بیوتیکپنیسیلین/استرپتومایسین) منتقل شدند ودرانکوباتور با ۹۵٪ رطوبت و ۵ درصد CO2 و دمای ^{o}C ۳۷ قرارداده شدند. سلول‌ها به روش کشت قطعه ای از ژله وارتون جدا شده و به کف فلاسک چسبیدند. ۲۴ ساعت بعد پس از اولین شستشو با بافر فسفات سالین باقی مانده های ژله وارتون حذف شدند.

تایید هویت سلولهای بنیادی ژله‌وارتون: سلولهای پاساژ سه به منظور تایید هویت سلولهای بنیادی ژله‌وارتون استخراج شده توسط دستگاه فلوسایتومتری (BD FACSCaliburBiosience, USA) از نظر بیان مارکرهای CD105، CD90، CD45،CD73 و CD34توسط آنتی بادیهای اختصاصی بررسی و نتایج با نرم افزار FlowJo نسخه ۷و۶و۱ آنالیز شد.

تهیه هیدروژل: به منظور ساخت هیدروژل ابتدا ۲۲۵ میلی‌گرم پودر CH را وزن کرده و بعد از استریل کردن در ۹ml اسیدکلریدریک ۰/۱ مولار به مدت چند ساعت روی شیکر با RPM ۱۴۰ قرار داده شد تا کاملا حل شود. در گام بعد ۲/۲۵ گرم از β-GF وزن کرده در ۳/۵ سی سی آب دیونیزه حل و با فیلتر استریل گردید. محلول استریل CH و β-GF هر دو به طور جداگانه به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ نگهداری شدند و سپس β-GF به صورت قطره قطره و به آرامی و در حالیکه محلول CH توسط مگنت با دور ثابت به هم‌زده می‌شد بر روی محلول CH اضافه شد. پس از اضافه کردن β-GF، حجم نهایی محلول CH و β-GF به ۱۵ml رسید. مقدار ۱۲۵ میلی گرم HEC (اتوکلاو شده) در ۱۰ سی سیPBS حل شد. HEC سرد با نسبت ۴/۸: ۰/۸ (HEC: CH- β-GF) به محلول CH- β-GF اضافه شد. اضافه کردن سلول همزمان با اضافه کردن HEC انجام شد.

ارزیابی موفولوژی و فرایند ژل‌شدن هیدروژل: به منظور تعیین زمان ژل شدن محلول HECدردمای پایین به CH-β-GF اضافه شد وهیدروژل حاصل شده به فور (دمای ثابت^{o}C ۳۷) انتقال داده شد و مدت زمان ژل‌شدن بررسی شد. به منظور بررسی مورفولوژی هیدروژل توسط freeze drier خشک شد و با استفاده از(Sputter coater (Technics, Hummer II, Japan پوشش طلا گرفته و با میکروسکوپ الکترونی HITACH- S4160 تصویر گرفته شد.

ارزیابی تمایز عصبی سلولهای بنیادی ژله‌وارتون: به منظور بررسی تمایز عصبی سلولهای بنیادی ژله‌وارتون درمحیط دوبعدی، این سلولها به مدت ۴ روز در محیط تمایز عصبی کشت شدند. اما در گروه کشت سه بعدی این سلولها پس از قرارگیری در هیدروژل در محیط کشت تمایز عصبی قرار گرفتند. محیط تمایز شامل DMEM/F12 ، سرم ۱۰٪KSR، فاکتور رشد۲۰EGFng/ml، فاکتور رشد ۲۰bFGFng/ml و ۱۰mg/ml هپارین بود. پس از ۴ روز سلولهای دو گروه مذکور و دو گروه کنترل فاقد محیط تمایزی از نظر مورفولوژی با میکروسکوپ فازکنتراست اینورت مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین Real Time-PCR با استفاده از پرایمر ژنهای Nestin ، β-Tubulin III و ژن β-actin (به عنوان کنترل داخلی) انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱. توالی پرایمرهای رفت و برگشت ژن

نام ژن	توالی رفت و برگشت
β-actin	Forward primer (5′-3′):acatcaaggagaagctgtgctac Reverse primer (3′-5′):cttcatgatggagttgaaggtagtt
Nestin	Forward primer (5′-3′):ggcttctctcagcatcttgg Reverse primer (3′-5′):aaggctggcataggtgtgtc
β-tubulinIII	Forward primer (5′-3′):cagagcaagaacagcagctactt Reverse primer (3′-5′):gtgaactccatctcgtccatgccctc

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.41.6]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.266]

استخراج RNA سلولها طبق دستورالعمل کیت کیاژن انجام و غلظت RNA هر نمونه با نانودراپ سنجیده شد. برای سنتزcDNAنیز ازکیت کیاژن طبق پروتکل شرکت سازنده استفاده شد. به منظور انجام Real-Time PCR برای هرژن یک کنترل منفی درنظرگرفته شد. برای هرنمونه ۳ تکرار تهیه شد. ترکیب هرنمونه شامل: ۱۰ میکرولیتر Syber green، ۱ میکرولیتر Rox، ۰/۷ میکرولیتر F primer، ۰/۷ میکرولیتر R Primer، ۱ میکرولیتر cDNA، ۶/۴ میکرولیتر Water RNase freeوحجم هر واکنش ۲۰ میکرولیتربود. در کنترل منفی تمامی ترکیب بالا به جز cDNA وجود داشت. واکنش در دستگاه ABI Step one طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real Time PCR در نظر گرفته شد. پس ازهر Run از PCR صحت هرمنحنی تکثیرتوسط منحنی Melting و با استفاده از دمای اختصاصی Melt of product که برای هر ژن اختصاصی است تایید شد. میزان بیان ژن هدف (Nestin وβ-Tubulin III) نسبت به ژن رفرنس (β-actin) بااستفاده ازفرمول ΔΔ CT محاسبه شد.

آزمونهای آماری: تجزیه و تحلیل کلیه داده ها با نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ ، تحلیل واریانس یک طرفه و رسم نمودار با نرم افزار Excel 2016 انجام شد. برای تحلیل نتایج حاصل از Real-Time PCR ، داده‌های خام توسط نرم افزار REST 2009 به داده‌های قابل تفسیر تبدیل شد. میزان بیان ژن هدف (Nestin وβ-Tubulin III) نسبت به ژن رفرنس (β-actin) بااستفاده ازفرمول ΔΔ CT محاسبه شد. سپس با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه، مقایسه و p<۰/۰۵معنی دار در نظر گرفته شد.

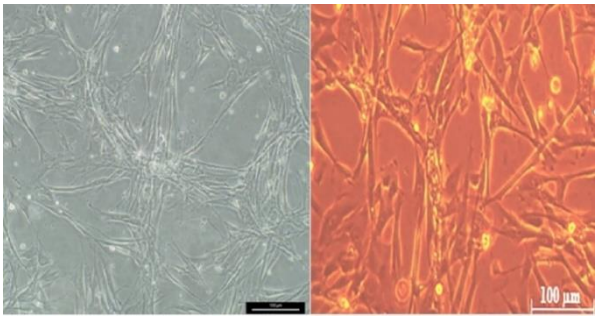
یافته ها

تایید هویت سلولهای بنیادی ژله‌وارتون: این سلولها ابتدا ظاهر گرد داشتند پس از ۲۴ ساعت به کف فلاسک چسبیده و ظاهر شبیه فیبروبلاست پیدا کردند (شکل۱). آنالیز فلوسایتومتری نشان داد (نمودار ۱) از بین مارکرهای مثبت سلولهای بنیادی CD44با ۹۸/۶٪ بیشترین بیان را داشته است و بقیه مارکرهای مثبت CD105، CD90، CD73 به ترتیب ۹۱/۴٪، ۹۸/۳٪ و ۹۵/۹٪ بیان داشته اند. همچنین مارکرهای منفی CD45 و CD34 به ترتیب ۴/۷۵٪ و ۲/۷۴٪ بیان داشته اند.

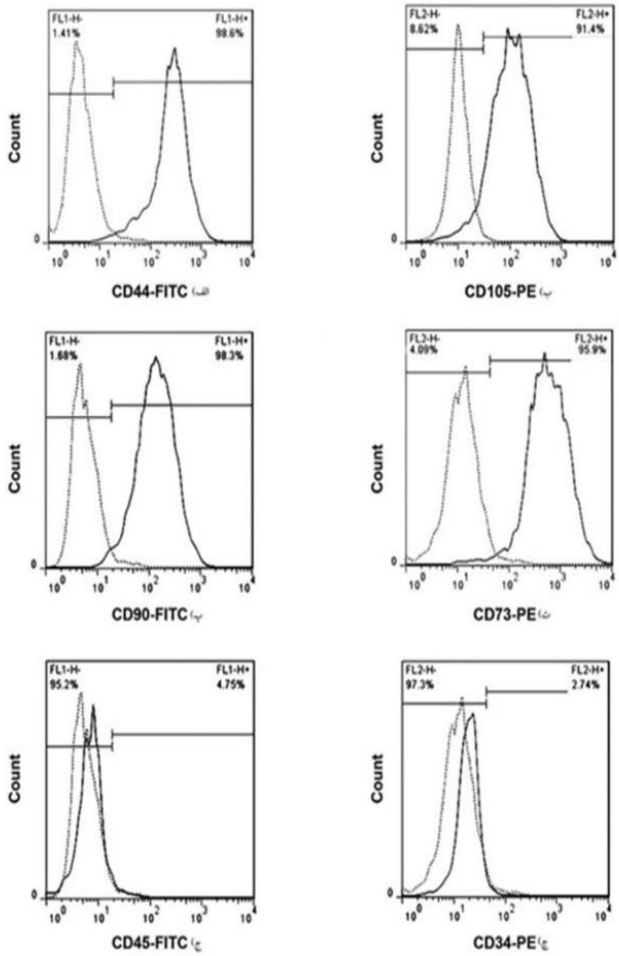
مورفولوژی متخلخل هیدروژل: ساختار هیدروژل پس از حذف آب آن، با میکروسکوپ SEM بررسی شد (شکل ۲). نتایج نشان داد ساختار این هیدروژل کاملاً متخلخل و منافذ با یکدیگر مرتبط هستند.

زمان ژل شدن هیدروژل: نتایج تعیین زمان ژل شدن نشان داد بعد از انتقال هیدروژل به فور ^{o}C ۳۷ بلافاصله ژل شدن آغاز و بعد از حدود ۲۵ دقیقه کامل می شود.

بررسی بیان ژنهای مربوط به تمایز عصبی در کشت دو بعدی و سه بعدی: نتایج بیان کمی ژنهای Nestin و β-Tubulin III (نمودار ۲) نشان داد بیان این ژنها در حضور محیط تمایز عصبی چه در شرایط کشت سه بعدی و چه در شرایط کشت دو بعدی افزایش می یابد. بیان این ژنها در شرایط کشت سه بعدی وحضور محیط تمایز عصبی نسبت به گروه کنترل سه بعدی فاقد محیط تمایزی(بیش از ۲ برابر) افزایش دارد (p<۰/۰۰۵). همچنین بیان این ژنها در شرایط کشت دو بعدی و حضور محیط تمایز عصبی نسبت به گروه کنترل فاقد محیط تمایزی(بیش از ۴ برابر) افزایش داشت (p<۰/۰۰۵).در مقایسه بین گروههای اصلی بیان این ژنها در شرایط سه بعدی فراهم شده توسط هیدروژل پایه کیتوزان و حضور محیط تمایز عصبی نسبت به شرایط دو بعدی مشابه افزایش (بیش از ۱/۵ برابر) نشان داد (p<۰/۰۱).

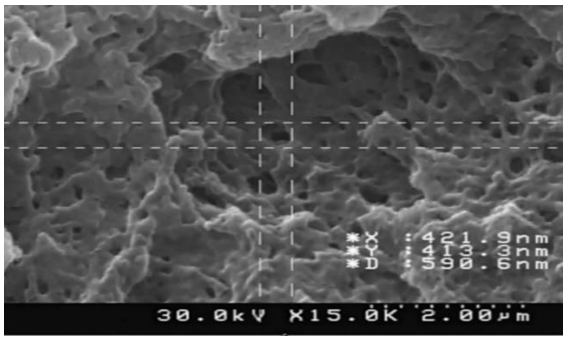


شکل ۱. مورفولوژی شبه فیبروبلاستی سلول های بنیادی ژله‌وارتون در محیط کشت DMEM/F12 در سمت راست و سلولهای بنیادی ژله‌وارتون القا شده به سلولهای عصبی در محیط کشت تمایزی بعد از ۴ روز در سمت چپ

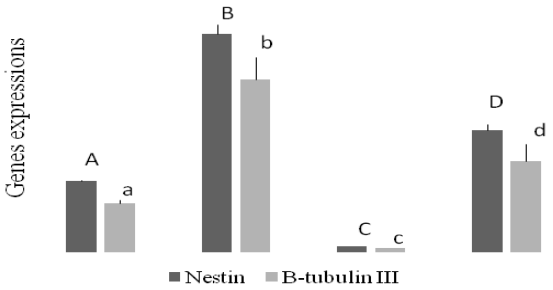


نمودار ۱. آنالیز فلوسایتومتری سلول های بنیادی ژله‌وارتون مارکر مثبت شامل: الف) CD44(۹۸/۶٪) ب) CD105(۹۱/۴٪) پ) CD90(۹۸/۳٪) ت) CD73(۹۵/۹٪) و مارکرهای منفی شامل: ج) CD45(۴/۷۵٪) چ) CD34(۲/۷۴٪)

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.41.6]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.266]



شکل ۲. مورفولوژی متخلخل هیدروژل CH-β-GP-HEC پس از حذف آب توسط میکروسکوپ الکترونی



نمودار ۲. نتایج بیان ژن Nestin و β-Tubulin III در گروه‌های مورد مطالعه بعد از ۴ روز. Three D without: کشت سه بعدی سلولها (درهیدروژل)،Three D with: کشت سه بعدی سلولها درحضور محیط تمایز عصبی ،Two D without: کشت دو بعدی سلولها، Two D with: کشت دو بعدی سلولها در حضورمحیط تمایز عصبی

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد بیان مارکرهای تمایز عصبی (β-Tubulin III وNestin) در شرایط کشت سه بعدی با استفاده از هیدروژل پایه کیتوزان CH-β-GP-HEC نسبت به محیط کشت دو بعدی افزایش می یابد.در این مطالعه سلولهای بنیادی ژله‌وارتون به روش کشت قطعات کوچک جداسازی شدند که یک روش مرسوم جداسازی این سلولها است(۲۰). سلولهای جدا شده به این روش مانند سایر سلولهای مزانشیمی، بعد از چسبیدن به کف ظرف کشت ظاهری مشابه فیبروبلاست پیدا کردند. بررسی فلوسایتومتری در راستای سایر مطالعات انجام شده در تعیین هویت این سلولها نشان داد مارکرهای سطحی سلول های هماتوپویتیک CD45 و CD34 توسط سلولها بیان نمی شود. درحالی که مارکرهای سطحی سلولهای بنیادی مزانشیمی شامل CD90، CD73، CD105 و CD44 بیان شدند (۲۰). نتایج ارزیابی مورفولوژی هیدروژل نشان داد، این هیدروژل همچون سایر هیدروژلهای پایه کیتوزان ساختاری متخلخل دارد و منافذ آن، با هم مرتبط هستند. تخلخل امکان قرارگیری سلول را فراهم می‌کند. و ارتباط بین منافذ باعث انتقال مواد غذایی و مواد دفعی می‌شود. ساختار متخلخل هیدروژل CH-β-GP-HEC میتواند شرایطی مناسب جهت رشد و تکثیر سلولهای بنیادی فراهم کند. در سایر مطالعات مربوط به این هیدروژلها نتایج مشابهی گزارش شده است (۲۱). مدت زمان ژل شدن هیدروژل CH-β-GP-HEC در دمای ۳۷ درجه حدود ۲۵ دقیقه می‌باشد. در حالیکه مدت زمان ژل شدن برای هیدروژل CH-β-GP ۶ دقیقه گزارش شده است (۲۲). ژل شدن سریع ممکن است اختلال در روند قرارگیری سلولها وارد کرده و باعث اعمال شوک به آنها شود. به نظر زمان بدست آمده برای هیدروژل CH-β-GP-HEC زمان بسیارمناسبی باشد. طبق نتایج بدست آمده از آزمون MTT بین گروه کنترل و سلولهایی که در تماس با هیدروژل بوده‌اند تفاوت معناداری از نظر بقا مشاهده نشد. از علل عدم سمیت هیدروژل میتوان به غلظت مناسب β-GP مورد استفاده اشاره کرد. برهمکنش قوی بین مولکولهای آب و CH مانع از توده‌ای یا ژل شدن آن میشود. با افزودن گلیسروفسفات دافعه الکترواستاتیکی زنجیره‌های CH توسط گروه فسفات نمک گلیسروفسفات خنثی میشود. در مقادیر بسیارکم نمک گلیسروفسفات با کاهش دما ژل ایجادشده به حالت محلول برمیگردد؛زیرامقادیربسیارکم نمک نمیتواندبردافعه الکترواستاتیک مابین زنجیره های کیتوزان غلبه کند(۲۳). یکی از راهکارهای مرسوم برای غلبه بر این مشکل افزایش مقدار نمک گلیسروفسفات می‌باشد(۲۵و۲۴). مشکل اساسی این روش افزایش سمیت در غلظت‌های بالای گلیسروفسفات میباشد. به منظور کاهش گلیسروفسفات مصرفی و افزایش زیست سازگاری این هیدروژل میتوان از عوامل شبکه کننده مانند HEC استفاده کرد (۲۶و۲۴). ترکیب مناسب هیدروژلCH-β-GP-HEC باعث شده است که این هیدروژل بتواند محیط مناسبی جهت تمایز انواع سلولها به رده های مختلف باشد. در مطالعه ای پتانسل تمایزکندورژنیک این هیدروژل برای سلولهای بنیادی مشتق از چربی مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد ساختار متخلخل این هیدروژل می تواند محیط مناسبی برای رشد و تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی بافت چربی به غضروف فراهم کند (۲۱). نتایج Real time PCR نشان داده که محیط سه بعدی هیدروژل بدون محیط کشت تمایز عصبی باعث افزایش بیان ژن Nestin و β-Tubulin III در سلول‌های بنیادی ژله‌وارتون شده است. بیان این مارکرهای عصبی در مدت زمان ۴ روزکه درنهایت باعث سنتزپروتئینهای عصبی میشوند، نشان دهنده آغاز تمایزسلولهای بنیادی ژله‌وارتون به سلولهای عصبی میباشد (۱۹). سلولهای بنیادی ژله‌وارتون در حضور هیدروژل و محیط تمایز عصبی، نسبت به بقیه گروه‌ها بیشترین بیان β-Tubulin III , Nestin را داشتند. این افزایش به علت هم افزایی تاثیر حضور هیدروژل CH-β-GP-HEC به عنوان محیط کشت سه بعدی و محیط تمایز عصبی بوده است که خود علتی بر مفید بودن این هیدروژل در تمایزعصبی سلولهای بنیادی ژله‌وارتون می‌باشد. علاوه بر بهره گیری از مزایای کشت سه بعدی در فراهم کردن شرایط طبیعی و نزدیک به بدن با توجه به هزینه بالای تهیه محیط کشت تمایز عصبی، هیدروژلی که بتواند در القا تمایز عصبی کمک کند از نظر اقتصادی مقرون به صرفه می باشد. از این مطالعه نتیجه گیری می‌شود کشت سه بعدی در هیدروژل CH-β-GP-HEC به تمایز عصبی سلولهای بنیادی ژله‌وارتون کمک میکند و میتواند به عنوان یک محیط کشت سه بعدی مناسب در آزمایشگاه جهت تکثیر و تمایز سلولهای مذکور و یا به عنوان یک حامل جهت تزریق و پیوند این سلولها به بخشهای مختلف سیستم عصبی استفاده گردد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران و همچنین خانم دکتر منصوره سلیمانی و دکتر سید محمد امین حرمشاهی که در انجام این پژوهش همکاری کردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.41.6]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.266]

Neural Differentiation of Wharton's Jelly Stem Cells in Three-Dimensional Chitosan Based Culture Environment

E. Mansoori (MSc)[1], Sh. Kermani (PhD)[1], A. Alizadeh (PhD)*[2]

1.Department of Material Engineerig, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Najafabad, I.R.Iran
2.Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 21; 2019; PP: 266-72
Received: Jan 1st 2019, Revised: Apr 16th 2019, Accepted: May 12th 2019.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Wharton Jelly Stem Cells (WJSCs) can be a good option for differentiating and regeneration of nervous system damage. Three dimensional (3D) cell cultures by providing a body-like environment have more advantages than the two dimensional (2D) cell cultures. The aim of this study was to investigate the neural differentiation of these cells in a 3D chitosan based culture environment.

METHODS: This experimental study was performed in 4 groups of 2&3D with and without differentiation media on WJSCs. First, to construct the hydrogel, hydroxyl ethyl cellulose was added to chitosan-beta-glycerophosphate solution (8.4: 0.8) (HEC: CH-β-GF). Human WJSCs after isolation by enzymatic method from wartons' jelly of born infant in Imam Khomeini hospital in Tehran and characterization with flow cytometry, were cultured 5×10^{5} cell in each well of 24-well plate in a 2D and 3D environment using the hydrogel in neural differentiation media for 4 days. Then, the neural differentiation of WJSCs was evaluated by quantitative analysis of β-Tubulin III, Nestin and β-actin (internal control) genes expression by Real Time PCR (RT-PCR).

FINDINGS: The results of RT-PCR showed that expression of β-Tubulin III and Nestin genes in WJSCs was significantly increased by the influence of the neural differentiation media in both 2D (more than 4 folds)and 3D (more than 2 folds) culture conditions ($p < 0.005$). But the expression of β-Tubulin III and Nestin in 3D cell culture condition (more than 1.5 folds) was greater than that in the 2D cell culture condition under the influence of the neural differentiation media ($p < 0.01$).

CONCLUSION: The results showed that neural differentiation of WJSCs in a chitosan based 3D environment is higher than 2D.

KEYWORDS: *Wharton's jelly, Stem cells, Neural Differentiation, Chitosan*.

Please cite this article as follows:

Mansoori E, Kermani Sh, Alizadeh A. Neural Differentiation of Wharton's Jelly Stem Cells in Three-Dimensional Chitosan Based Culture Environment. J Babol Univ Med Sci. 2019; 21: 266-72.

***Corresonding Author: A. Alizadeh (PhD)**
Address: Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, I.R.Iran
Tel: +98 23 33441022
E-mail: alizadeh.a@Semums.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.41.6]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.266]

References

1.Levy M, Boulis N, Rao M, Svendsen CN. Regenerative cellular therapies for neurologic diseases. Brain res. 2016;1638(Pt A):88-96.

2.Eftekharzadeh M, Nobakht M, Alizadeh A, Soleimani M, Hajghasem M, Kordestani Shargh B, et al. The effect of intrathecal delivery of bone marrow stromal cells on hippocampal neurons in rat model of Alzheimer's disease. Iran J Basic Med Sci. 2015;18(5):520-25.

3.Jaimes-Parra BD, Garzon I, Carriel V, Durand-Herrera D, Martín-Piedra MA, García JM, et al. Membranes derived from human umbilical cord Wharton's jelly stem cells as novel bioengineered tissue-like constructs. Histol Histopathol. 2018;33(2):147-56.

4.Balasubramanian S, Thej C, Venugopal P, Priya N, Zakaria Z, Sundarraj S, et al. Higher propensity of Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells towards neuronal lineage in comparison to those derived from adipose and bone marrow. Cell Biol Int. 2013;37(5):507-15.

5.Sanluis-Verdes A, Sanluis-Verdes N, Manso-Revilla MJ, Castro-Castro AM, Pombo-Otero J, Fraga-Mariño M, et al. Tissue engineering for neurodegenerative diseases using human amniotic membrane and umbilical cord. Cell Tissue Bank. 2017;18(1):1-15.

6.Zhang L, Wang LM, Chen WW, Ma Z, Han X, Liu CM, et al. Neural differentiation of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells improves the recovery of neurological function after transplantation in ischemic stroke rats. Neural Regen Res. 2017;12(7):1103-10.

7.Ruedinger F, Lavrentieva A, Blume C, Pepelanova I, Scheper T. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice. Appl Microbiol Biotechnol. 2015;99(2):623-36.

8.D'Aiuto L, Bloom DC, Naciri JN, Smith A, Edwards TG, McClain L, et al. Modeling Herpes Simplex Virus 1 Infections in Human Central Nervous System Neuronal Cells Using Two- and Three-Dimensional Cultures Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. J Virol. 2019; 93(9): pii: e00111-19.

9.Nierode GJ, Gopal S, Kwon P, Clark DS, Schaffer DV, Dordick JS. High-throughput identification of factors promoting neuronal differentiation of human neural progenitor cells in microscale 3D cell culture. Biotechnol Bioeng. 2019;116(1):168-80.

10.Jiao J, Huang J, Zhang Z. Hydrogels based on chitosan in tissue regeneration: How do they work? A mini review. J Appl Polym Sci. 2018;136;47235.

11.Carballo-Molina OA, Velasco I. Hydrogels as scaffolds and delivery systems to enhance axonal regeneration after injuries. Front Cell Neurosci. 2015;9(13):1-12

12.Hosseini SM, Vasaghi A, Nakhlparvar N, Roshanravan R, Talaei-Khozani T, Razi Z. Differentiation of Wharton's jelly mesenchymal stem cells into neurons in alginate scaffold. Neural Regen Res. 2015;10(8);1312-6.

13.Gnavi S, Barwig C, Freier T, Haastert-Talini K, Grothe C, Geuna S. The use of chitosan-based scaffolds to enhance regeneration in the nervous system. Int Rev Neurobiol. 2013;109:1-62.

14.Fregnan F, Ciglieri E, Tos P, Crosio A, Ciardelli G, Ruini F, et al. Chitosan crosslinked flat scaffolds for peripheral nerve regeneration. Biomed Mater. 2016;11(4):045010.

15.Shen X, Shamshina JL, Berton P, Gurau G, Rogers RD. Hydrogels based on cellulose and chitin: fabrication, properties, and applications. Green Chem. 2016;18(1):53-75.

16.Gawish AS, Bilal MM. Smart Liposomal Chitosan-Based Auto Gel with Ofloxacin; a new Controlled Release Device used for Treatment of Chronic Periodontitis. a Randomized, Double-Blind Controlled Clinical Trials. Med Clin Res. 2017;2(3):1-7.

17.Dashtimoghadam E, Bahlakeh G, Salimi-Kenari H, Hasani-Sadrabadi MM, Mirzadeh H, Nystrom B. Rheological Study and Molecular Dynamics Simulation of Biopolymer Blend Thermogels of Tunable Strength. Biomacromolecules. 2016;17(11):3474-84.

18.Liu L, Gao Q, Lu X, Zhou H. In situ forming hydrogels based on chitosan for drug delivery and tissue regeneration. Asian J Pharm Sci. 2016;11(6):673-83

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.41.6]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.266]

19.Liu C, Zhong Y, Apostolou A, Fang S. Neural differentiation of human embryonic stem cells as an in vitro tool for the study of the expression patterns of the neuronal cytoskeleton during neurogenesis. Biochem Biophys Res Commun. 2013;439(1)154-9.

20.Hosseini A, Estiri H, Akhavan Niaki H, Alizadeh A, Abdolhossein Zadeh B, Ghaderian SMH, et al. Multiple Sclerosis Gene Therapy with Recombinant Viral Vectors: Overexpression of IL-4, Leukemia Inhibitory Factor, and IL-10 in Wharton's Jelly Stem Cells Used in EAE Mice Model. Cell J. 2017;19(3)361-374.

21. Karimpour A, Talebpour Amiri F, Ghaffari E, Alizadeh A, Jamalpour Z, Mirhosseini M, et al . Growth and Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue on Chitosan Scaffolds. J Babol Univ Med Sci. 2016; 18(9):32-8. [In Persian]

22.Niranjan R, Koushik C, Saravanan S, Moorthi A, Vairamani M, Selvamurugan N. A novel injectable temperature-sensitive zinc doped chitosan/β-glycerophosphate hydrogel for bone tissue engineering. Int J Biol Macromol. 2013;54:24-9.

23.Ganji F, Hoobakht F, Ghasemi Tahrir F, Vasheghani-Farahani E. In Vitro Sustained Release of Pyridostigmin Bromide from Injectable Thermosensitive Chitosan Hydrogel. *Iran J Biomed Engin.* 2014; 8(3): 249-60. [In Persian]

24.Kim S, Nishimoto SK, Bumgardner JD, Haggard WO, Gaber MW, Yang Y. A chitosan/β-glycerophosphate thermo-sensitive gel for the delivery of ellagic acid for the treatment of brain cancer. Biomaterials. 2010;31(14):4157-66.

25.Wu J, Su ZG, Ma GH. A thermo-and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate. Int J Pharm. 2006;315(1-2):1-11.

26.Yan J, Yang L, Wang G, Xiao Y, Zhang B, Qi N. Biocompatibility evaluation of chitosan-based injectable hydrogels for the culturing mice mesenchymal stem cells in vitro. J Biomater Appl. 2010;24(7):625-37.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.41.6]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.266]